

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS - UNIFAL - MG**

**RAPHAEL ANTÔNIO BORGES GOMES**

**CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE NANOTUBOS DE CARBONO DE  
ACESSO RESTRITO NA EXTRAÇÃO DE FERRO EM SOLUÇÕES AQUOSAS  
E PRODUÇÃO DE APOPROTEÍNAS A PARTIR DA CATALASE**

**Alfenas /MG**

**2022**

**RAPHAEL ANTÔNIO BORGES GOMES**

**CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE NANOTUBOS DE CARBONO DE  
ACESSO RESTRITO NA EXTRAÇÃO DE FERRO EM SOLUÇÕES AQUOSAS  
E PRODUÇÃO DE APOPROTEÍNAS A PARTIR DA CATALASE**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Química Analítica

Orientador: Prof. Dr. Pedro Orival Luccas  
Coorientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Cristiana Schmidt de Magalhães

**Alfenas /MG**

**2022**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas

G633c Gomes, Raphael Antônio Borges  
Caracterização e aplicação de nanotubos de carbono de acesso restrito na extração de ferro em soluções aquosas e produção de apoproteínas a partir da catalase / Raphael Antônio Borges Gomes. -- Alfenas/MG, 2022.  
118 f. : il. –

Orientador: Pedro Orival Luccas.  
Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Alfenas, 2022.  
Bibliografia.

1. Nanotubos. 2. Materiais nanoestruturados. 3. Adsorção. 4. Ferro.  
5. Proteínas. 6. Catalase. I. Luccas, Pedro Orival, orient. II. Título.

**CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE NANOTUBOS DE CARBONO DE ACESSO RESTRITO NA EXTRAÇÃO DE FERRO EM SOLUÇÕES AQUOSAS E PRODUÇÃO DE APOPROTEINAS A PARTIR DA CATALASE**

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Química Analítica.

Aprovado em: 30 de março de 2022

Prof. Dr. Pedro Orival Luccas - Presidente e Orientador  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas - Unifal

Profa. Dra. Mariane Gonçalves Santos  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas - Unifal

Profa. Dra. Giovana de Fátima Lima Martins  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas - Unifal

Profa. Dra. Gisele Simone Lopes  
Instituição: Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Eduardo José de Arruda  
Instituição: Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD)



Documento assinado eletronicamente por **Mariane Gonçalves Santos Professor do Magistério Superior**, em 30/03/2022, às 16:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#)



Documento assinado eletronicamente por **Pedro Orival Luccas Professor do Magistério Superior**, em 30/03/2022, às 16:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#)



Documento assinado eletronicamente por **Giovana de Fatima Lima Martins, Professor do Magistério Superior**, em 30/03/2022, às 17:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gisele Simone Lopes Usuário Externo**, em 05/04/2022, às 12:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#)



Documento assinado eletronicamente por **Eduardo Jose de Arruda Usuário Externo**, em 05/04/2022, às 16:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#)



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0700332** e o código CRC**230FC98B**

*“Educação não transforma o mundo.  
Educação muda as pessoas.  
Pessoas mudam o mundo”*

*(Paulo Freire)*

## AGRADECIMENTOS

**A Deus**, primeiramente, por me dar força sempre.

**Aos meus pais**, Terezinha e Devair por sempre acreditarem em mim e me incentivarem com muito carinho e amor. Amo vocês!

**À minha esposa**, Poliana, que sempre esteve ao meu lado. Pela cumplicidade, companheirismo, amizade e amor. Pelo incentivo diário, nunca me deixando desanimar.

**Aos meus irmãos**, Pedrinho e Diego, obrigado por tudo. Amo vocês!

**Aos meus estimados orientadores, Prof. Dr. Pedro Orival Luccas e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristiana Schmidt de Magalhães**, por todos os momentos de discussões. Por seus sábios conselhos profissionais e pessoais. Pelas instigações, trabalhos exaustivos e enorme aprimoramento em minha formação acadêmica. Pelo convívio e conhecimento. **Aos Profe. Drs. Adriano Aguiar Mendes e Eduardo Costa de Figueiredo**, pela ajuda fundamental e todos os conhecimentos compartilhados.

**Ao professor Pedro Paulo Czimar** (*in memoriam*), que um dia na minha sexta série me mostrou que estudar é o melhor caminho.

**À minha saudosa amiga Fernanda Olímpio** (*in memoriam*), dedico este trabalho a você e tenho certeza que se estivesse aqui, estaria me prestigiando nesse momento e à toda “turma de quinta”, Carol, Rod, Andressa, Cintinha e Poliana. Obrigado pela amizade.

**À pesquisadora Dra. Tatiana Ribeiro (UFMG)**, pela cordialidade e pronto atendimento para realização de alguns trabalhos.

**Aos meus amigos e companheiros de sempre**, Nyanne C. Freire, Maicon Batista Novais e todos amigos de Alfenas, que nossa amizade seja eterna!

**A todos os amigos da Química**, aos amigos do LabIQ e LACFar e Limnologia, meu muito obrigado!

**Aos técnicos do laboratório**, Carolina Nasser, Dênis, Bernadete, pela paciência em sempre me ajudar com reagentes, empréstimos e outras coisas. Obrigado!

**À Escola de Nutrição-UFOP**, amigos e companheiros de trabalho, muito obrigado.

**A todos os amigos, familiares e professores**, incluindo os não citados que diretamente ou indiretamente estiveram comigo e contribuíram para minha formação e crescimento como pessoa, sempre estarão presentes em minha vida.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

## RESUMO

Os Nanotubos de carbono (CNT), nanotubos de carbono oxidado (CNTox) e nanotubos de carbono de acesso restrito revestidos com albumina de soro bovino (RACNT-BSA) foram sintetizados e caracterizados por microscopia eletrônica de transmissão (MET), microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia por energia dispersiva de raios X (MEV-EDS), análise termogravimétrica (TGA), espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), espectroscopia Raman e potencial zeta (PZ). Defeitos estruturais foram observados por MET para os materiais oxidados. A maior estabilidade térmica foi observada para CNTox e os espectros de espectroscopia Raman e as curvas de PZ também confirmaram a presença de grupos funcionais após a oxidação ácida, característica importante para a adsorção do metal. Os materiais foram empregados na adsorção de ferro em solução aquosa e proteicas e utilizou-se a Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (FAAS) para detecção. As capacidades adsorptivas de ferro dos materiais foram  $44,73 \pm 0,29$ ,  $43,29 \pm 0,11$  e  $31,55 \pm 0,29$  mg g<sup>-1</sup>, respectivamente para CNT, CNTox e RACNT-BSA. O modelo fracionário de Avrami foi o que melhor se ajustou aos dados de cinética para todos os materiais, sugerindo que o mecanismo de interação é baseado na quimissorção e fisissorção. Com relação ao mecanismo de adsorção pelo ajuste do modelo de Weber-Morris, foram predominantes os mecanismos de difusão externa e difusão intrapartícula para o CNT e CNTox e para o RACNT-BSA ocorreu preferencial adsorção na sua parte externa, seguido de condição de equilíbrio. Os testes de dessorção empregando CNT mostraram que a máxima dessorção dos íons ferro foi obtida empregando uma solução de acetato de sódio (1,5 mol L<sup>-1</sup>). Testes de reuso revelaram que os materiais podem ser aplicados em 5 sucessivos ciclos de adsorção/dessorção sem perdas de eficiência. Assim, CNT e CNTox podem ser excelentes alternativas para extração de ferro de soluções aquosas, enquanto RACNT-BSA se mostrou eficiente na extração de ferro de meios proteicos, sendo promissor para preparo de amostras biológicas e na produção de apoproteínas.

**Palavras-chave:** Nanotubos de carbono, Material de acesso restrito, Mecanismo de Adsorção, extração de ferro, Apoproteínas.

## ABSTRACT

Carbon nanotubes (CNT), oxidized carbon nanotubes (oxCNT) and restricted access carbon nanotubes coated with bovine serum albumin (RACNT-BSA) were synthesized and characterized by Transmission electron microscopy (TEM), scanning electron microscopy and energy dispersive X-ray spectroscopy (SEM-EDS), Thermogravimetric analysis (TGA), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), Raman spectroscopy and zeta potential (ZP). Structural defects were observed by TEM for the oxidized materials. The highest thermal stability was observed for oxCNT and the Raman spectra and zeta potential curves also confirmed the presence of functional groups after acid oxidation. These functional groups are important for the metal adsorption on materials' surface. The materials were used for the adsorption of iron from aqueous and protein solution and Flame Atomic Absorption Spectrometry (FAAS) was used to detect it. The materials' adsorption capacities of iron were  $44.73 \pm 0.29$ ,  $43.29 \pm 0.11$  and  $31.55 \pm 0.29$  mg. g<sup>-1</sup>, respectively for CNT, oxCNT and RACNT-BSA. Avrami's fractional model was the one that best fitted the kinetic data for all materials, suggesting that the interaction mechanism is based on chemisorption and physisorption. Regarding the adsorption mechanism by fitting the Weber-Morris model, external and intraparticle diffusion mechanisms were predominant for CNT and oxCNT, and for RACNT-BSA there was preferential adsorption in its external part followed by equilibrium condition. The desorption tests using CNT showed that the maximum desorption of iron ions was obtained using a sodium acetate solution (1.5 mol L<sup>-1</sup>). Reuse tests revealed that the materials can be applied up to 5 successive adsorption/desorption cycles, without loss of efficiency. Thus, CNT and oxCNT can be excellent alternatives for extracting iron from aqueous solutions, while RACNT-BSA has been shown to be efficient in the extraction of iron from protein media, being promising for the preparation of biological samples and in the apoprotein production.

**Keywords:** Carbon nanotubes, Restricted access materials, Adsorption Mechanism, Electrostatic Interactions, Apoproteins.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	(a) Representação do arcabouço proteico da BSA e (b) estrutura tridimensional da HSA.....	21
Figura 2 -	Complexação do íon metálico com um dipeptídeo com cadeias laterais não complexantes.....	24
Figura 3 -	Complexação do íon metálico com um tripeptídeo Gly-Gly-His.....	25
Figura 4 -	Estrutura proteica, holoenzima, cofator e apoenzima.....	28
Figura 5 -	Estrutura tridimensional da enzima CAT e os quatro grupo heme.....	30
Figura 6 -	Tipos de CNT, em (a) nanotubos de carbono de parede simples, (b) paredes duplas e (c) paredes múltiplas.....	31
Figura 7 -	Ilustração das diferentes funcionalizações dos CNT.....	34
Figura 8 -	Mecanismos de interações entre os CNT e metais.....	39
Figura 9 -	Esquema do mecanismo de sorção de íons metálicos bivalentes na superfície dos CNT.....	40
Figura 10 -	Aplicações médicas e farmacêuticas dos CNT.....	41
Figura 11 -	Mecanismos de interações entre o CNT e proteínas.....	43
Figura 12 -	Esquema representando a exclusão de proteínas e retenção das pequenas moléculas nas fases hidrofóbicas RAM-BSA.....	45
Figura 13 -	Técnicas de: (a) extração em fase sólida, (b) microextração em fase sólida e (c) extração por sortiva em barra de agitação.....	45
Figura 14 -	Nanotubos de carbono de acesso restrito revestidos com camada externa de BSA entrecruzada quimicamente com glutaraldeído (RACNT-BSA).....	50
Figura 15 -	Processo de adsorção em um sólido adsorvente.....	51
Figura 16 -	Processos envolvidos na adsorção em adsorventes porosos.....	56
Figura 17 -	Fluxograma geral da metodologia.....	64
Figura 18 -	Sequência das etapas de funcionalização do CNT.....	65
Figura 19 -	Representação esquemática do recobrimento dos CNT oxidados...	66

Figura 20 -	Esquema representativo da metodologia do estudo de interação entre o RACNT-BSA e CAT.....	72
Figura 21 -	Reação entre a BSA imobilizada e o glutaraldeído, e subsequente intercruzamento de ligações.....	75
Figura 22 -	Imagens de MET dos materiais: (a) CNT, (b) CNT <sub>ox</sub> e (c) RACNT-BSA e MEV em (d) CNT, (e) CNT <sub>ox</sub> e (f) RACNT-BSA.....	77
Figura 23 -	Curvas de TGA/DTG dos materiais CNT, CNT <sub>ox</sub> , RACNT-BSA e BSA.....	78
Figura 24 -	Espectros de infravermelho dos materiais CNT, CNT <sub>ox</sub> , RACNT-BSA e BSA.....	79
Figura 25 -	Espectros Raman dos materiais CNT, CNT <sub>ox</sub> , RACNT-BSA e BSA.....	81
Figura 26 -	Potencial Zeta dos materiais CNT, CNT <sub>ox</sub> , RACNT-BSA e BSA..	82
Figura 27 -	Mecanismos de interação entre o RACNT-BSA e íon Fe (III).....	83
Figura 28 -	Efeito do tempo de contato de entre os íons Fe (III) e os materiais: CNT, CNT <sub>ox</sub> e RACNT-BSA.....	84
Figura 29 -	Dados experimentais de adsorção de íons Fe (III) nos materiais: (a) CNT, (b) CNT <sub>ox</sub> e (c) RACNT-BSA e modelos cinéticos.....	85
Figura 30 -	Modelo de difusão intrapartícula de Weber e Morris aplicado à adsorção de Fe (III) em solução (50 ppm) para os materiais CNT, CNT <sub>ox</sub> e RACNT-BSA.....	89
Figura 31 -	(a) Efeito da concentração de acetato de sódio na dessorção de Fe (III) material CNT e (b) Eficiência de dessorção dos materiais CNT, CNT <sub>ox</sub> e RACNT-BSA.....	91
Figura 32 -	Ciclos de reutilização de adsorção/dessorção dos materiais CNT, CNT <sub>ox</sub> e RACNT-BSA.....	93
Figura 33 -	Efeito do pH na exclusão de catalase do RACNT-BSA.....	95
Figura 34 -	Quadro representativo dos pontos isoelétricos dos materiais estudados.....	96
Figura 35 -	Distribuição de resíduos positivos e negativos em BSA e CAT.....	97
Figura 36 -	Dados de atividade da CAT antes e após da percolação.....	98
Figura 37 -	Percentual de íons Fe extraídos da CAT.....	99

Figura 38 - Relação dos parâmetros percentual de extração, atividade enzimática e percentual de Fe extraído..... 100

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Concentração ( $\text{mol dm}^{-3}$ ) de metais nos organismos.....	22
Quadro 2 -	Doenças e sintomas causados pela deficiência de metais.....	22
Quadro 3 -	Cadeias laterais de aminoácidos que interagem com íons metálicos.....	23
Quadro 4 -	Classificação dos ácidos e bases de Lewis.....	26
Quadro 5 -	Peptídeos que interagem com íon metálicos.....	27
Quadro 6 -	Classificação das metaloenzimas pela IUBMB.....	27
Quadro 7 -	Metaloproteínas e seus respectivos cofatores metálicos.....	29
Quadro 8 -	Aplicação dos CNT na adsorção de íons metálicos em meio aquoso.....	35
Quadro 9 -	Aplicação dos CNT utilizados como sorventes em matrizes complexas.....	37
Quadro 10 -	Aplicação dos CNT com macromoléculas.....	41
Quadro 11 -	Algumas aplicações recentes de RAM para determinação direta de analitos orgânicos em matrizes complexas.....	46
Quadro 12 -	Algumas aplicações recentes de RAM para determinação direta de analitos orgânicos em matrizes complexas.....	48
Quadro 13 -	Descrição dos materiais e siglas correspondentes.....	64
Quadro 14 -	Modelos cinéticos e equações.....	71

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Dados experimentais de EDS dos materiais CNT, CNTox e RACNT-BSA.....	77
Tabela 2 -	Parâmetros dos modelos cinéticos de adsorção e valores de função de erro e coeficiente de determinação.....	87
Tabela 3 -	Parâmetros de difusão intrapartícula.....	89
Tabela 4 -	Parâmetros termodinâmicos para adsorção de Fe (III) nos materiais CNT, CNTox e RACNT-BSA.....	90

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADM	Modelo difusional de adsorção (do inglês, Adsorption Difusional Model)
ARM	Modelo reacional de adsorção (do inglês, Adsorption Reaction Model)
BSA	Albumina de soro bovina (do inglês, bovine serum albumin)
BTEX	Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xilenos
CAT	Catalase
CNT	Nanotubos de carbono (do inglês, carbon nanotubes)
CNTox	Nanotubos de carbono oxidados (do inglês, carbon nanotubes)
DEM	Modelo exponencial duplo (do inglês, Double Exponential Model)
DMF	Dimetilformamida
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês, Deoxyribonucleic Acid)
DTA	Análise térmica diferencial (do inglês, Differential thermal analysis)
DTG	Derivada da termogravimétrica
DWCNT	Nanotubos de carbono de paredes dupla (do inglês, double-walled carbon nanotubes)
FAAS	Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (do inglês, Flame Atomic Absorption Spectrometry)
FTIR	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (do inglês, Fourier transform infrared spectroscopy)
HPAs	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
HSA	Albumina de soro humano (do inglês, human serum albumin)
IUBMB	União internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (do inglês, International Union of Biochemistry and Molecular Biology)
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV-EDS	Microscopia eletrônica de varredura com espectroscopia de energia dispersiva de raio X
MSPD	Dispersão de matriz em fase sólida (do inglês, <i>Matrix solid-phase dispersion</i> )

MWCNT	Nanotubos de carbono de paredes múltiplas (do inglês, multi-walled carbon nanotubes)
PCZ	Ponto de carga zero
pH	Potencial hidrogeniônico
pI	Ponto isoelétrico
PZ	Potencial Zeta
RACNT-BSA	Nanotubos de carbono de acesso restrito por meio de recobrimento com albumina (do inglês, <i>restricted access carbon nanotubes coated with bovine serum albumin</i> )
RAM	Material de acesso restrito (do inglês, restricted access media)
RAM-BSA	Material de acesso restrito imobilizada do tipo albumina sérica bovina (do inglês, Restricted Access Media – Bovine Serum Albumin)
SBSE	Extração sortiva em barra de agitação (do inglês, <i>Stir bar sorptive extraction</i> )
SPE	Extração em fase sólida (do inglês, <i>Solid Phase Extraction</i> )
SPME	Microextração em fase sólida (do inglês, <i>Solid Phase Microextraction</i> )
SWCNT	Nanotubos de carbono de parede simples (do inglês, single-walled carbon nanotubes)
TGA	Análise termogravimétrica (do inglês, thermogravimetric analysis)
$\Delta G$	Variação da energia de Gibbs

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>20</b>
2.1	ALBUMINAS.....	20
<b>2.2</b>	<b>INTERAÇÃO METAIS PROTEÍNAS.....</b>	<b>21</b>
<b>2.2.1</b>	<b>Importância biológica dos metais.....</b>	<b>22</b>
<b>2.2.2</b>	<b>Interação dos metais com peptídeos.....</b>	<b>23</b>
<b>2.2.3</b>	<b>Metaloproteínas.....</b>	<b>27</b>
2.2.3.1	Apoproteínas.....	28
2.2.3.2	Catalase (CAT).....	29
2.3	NANOTUBOS DE CARBONO E SUAS PROPRIEDADES.....	30
<b>2.3.1</b>	<b>Tipos de nanotubos de carbono.....</b>	<b>31</b>
<b>2.3.2</b>	<b>Purificação e funcionalização dos CNT.....</b>	<b>32</b>
2.3.2.1	Purificação.....	32
2.3.2.2	Funcionalização.....	33
<b>2.3.3</b>	<b>Aplicação dos CNT.....</b>	<b>35</b>
2.3.3.1	Aplicação de CNT na adsorção de metais.....	35
2.3.3.2	Mecanismos de interação entre CNT e metais.....	38
2.3.3.3	Aplicações dos CNT e toxicidade.....	40
2.3.3.4	Aplicação dos CNT funcionalizados com macromoléculas.....	41
2.3.3.5	Mecanismo de adsorção entre CNT e proteínas.....	42
2.4	MATERIAIS DE ACESSO RESTRITO (RAM).....	43
<b>2.4.1</b>	<b>CNT de acesso restrito à ligação com macromoléculas por meio de recobrimento com albumina (RACNT-BSA).....</b>	<b>47</b>
2.5	ADSORÇÃO.....	50
<b>2.5.1</b>	<b>Tipos de adsorção.....</b>	<b>52</b>

2.5.1.1	Adsorção física ou fisissorção.....	52
3.5.1.2	Adsorção química ou quimissorção.....	52
<b>2.5.2</b>	<b>Fatores que afetam no processo de adsorção.....</b>	<b>53</b>
<b>2.5.3</b>	<b>Cinética de adsorção.....</b>	<b>54</b>
<b>2.5.4</b>	<b>Modelos cinéticos de adsorção.....</b>	<b>56</b>
2.5.4.1	Pseudo-primeira ordem.....	56
2.5.4.2	Pseudo-segunda ordem.....	58
2.5.4.3	Elovich (quimissorção).....	59
2.5.4.4	Avrami (fracionário).....	59
2.5.4.5	Mecanismo de adsorção: Modelo de Difusão Intrapartícula.....	61
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>62</b>
3.1	OBJETIVO GERAL.....	62
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	62
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>63</b>
4.1	MATERIAL DE PARTIDA.....	63
4.2	REAGENTES E SOLUÇÕES.....	63
4.3	METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	63
<b>4.3.1</b>	<b>Descrição dos materiais.....</b>	<b>64</b>
<b>4.3.2</b>	<b>Preparo e síntese dos materiais CNT, CNTox e RACNT-BSA (ETAPA I).....</b>	<b>65</b>
4.3.2.1	Funcionalização dos CNT .....	65
4.3.2.2	Recobrimento dos CNTox com BSA (RACNT-BSA).....	66
4.4	TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO (ETAPA II).....	67
<b>4.4.1</b>	<b>MEV-EDS.....</b>	<b>67</b>
<b>4.4.2</b>	<b>MET.....</b>	<b>67</b>
<b>4.4.3</b>	<b>Análise termogravimétrica (TGA).....</b>	<b>67</b>
<b>4.4.4</b>	<b>FTIR.....</b>	<b>68</b>

4.4.5	<b>Espetroscopia Raman.....</b>	68
4.4.6	<b>PZ.....</b>	68
4.5	ESTUDO CINÉTICO (ETAPA III).....	69
4.5.1	<b>Experimentos de adsorção.....</b>	69
4.5.2	<b>Dessorção e reutilização dos materiais.....</b>	70
4.5.3	<b>Estudo da cinética de adsorção.....</b>	71
4.6	ESTUDO DE INTERAÇÃO ENTRE RACNT-BSA E CATALASE (ETAPA IV).....	72
4.6.1	<b>Avaliação da exclusão de CAT pelos RACNT-BSA em relação ao pH.....</b>	73
4.6.2	<b>Estudo da atividade da CAT em relação ao pH.....</b>	73
4.6.3	<b>Extração do Ferro da CAT.....</b>	74
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	75
5.1	RECOBRIMENTO DOS CNT FUNCIONALIZADOS COM BSA (RACNT-BSA).....	75
5.2	CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS.....	76
5.2.1	<b>MEV-EDS e MET.....</b>	76
5.2.2	<b>Análise termogravimétrica (TGA).....</b>	78
5.2.3	<b>FTIR.....</b>	79
5.2.4	<b>Espetroscopia Raman.....</b>	80
5.2.5	<b>PZ.....</b>	81
5.3	ESTUDO CINÉTICO.....	83
5.3.1	<b>Efeito do tempo de contato no processo de adsorção de Fe (III) nos materiais.....</b>	83
5.3.2	<b>Cinética de adsorção e mecanismos de interações.....</b>	85
5.3.3	<b>Estudos de dessorção e regeneração.....</b>	90
5.4	ESTUDO DE INTERAÇÃO ENTRE O RACNT-BSA E A PROTEÍNA – CAT.....	94

<b>5.4.1</b>	<b>Avaliação da exclusão de proteínas CAT pelos RACNT-BSA em função do pH.....</b>	<b>94</b>
<b>5.4.2</b>	<b>Estudo da atividade da CAT em relação ao pH.....</b>	<b>97</b>
<b>5.4.3</b>	<b>Extração de Fe da CAT e determinação de Apoproteína.....</b>	<b>98</b>
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>101</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>102</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os ambientes aquáticos têm sido degradados devido a uma variedade de efluentes gerados de indústrias de mineração, refino de petróleo, têxtil, agrotóxicos, tintas e pigmentos (DUAN *et al.*, 2020; HOANG *et al.*, 2022). Conseqüentemente, há uma variedade de metais nesses efluentes, como chumbo, cádmio, cobre, arsênio, níquel, cromo, zinco, mercúrio e ferro (HOANG *et al.*, 2022; ZHAI *et al.*, 2020). Esses metais podem representar um grande risco para humanos e animais, causando doenças graves e distúrbios neurológicos (HOANG *et al.*, 2022).

Especificamente em Minas Gerais, Brasil, uma quantidade elevada de íons ferro presente nos efluentes, devido ao descarte inadequado das indústrias siderúrgicas e de mineração, tornando-se um problema ambiental. Assim, sua remoção é de grande importância (DUAN *et al.*, 2020; HOANG *et al.*, 2022).

Muitos metais poluentes, se encontram em concentrações que não são detectadas pelas técnicas convencionais de análise química. Nesse contexto, estratégias para extrair e pré-concentrar, esses metais, são necessárias antes de seu monitoramento analítico.

Uma variedade de adsorventes à base de nanotubos de carbonos (CNT, do inglês *carbon nanotubes*) tem sido aplicada nesses casos. A versatilidade desses nanomateriais está relacionada às diferentes formas de modificação superficial, podendo ser aplicados em diferentes amostras (IIJIMA, 1991; SABZEHMEIDANI *et al.*, 2021; SINGH *et al.*, 2021).

Os CNT, foram descobertos pelo cientista japonês Sumio Iijima em 1991 (IIJIMA, 1991). Desde então, têm sido aplicados em várias áreas da ciência. Especificamente na química analítica, estes nanomateriais, são amplamente explorados na extração e pré concentração de analitos orgânicos e inorgânicos (DE FARIA *et al.*, 2017; HOANG *et al.*, 2022).

Esses materiais podem ser utilizados em suportes cromatográficos na extração em fase sólida (SPE, do inglês *solid-phase extraction*), dispersão de matriz em fase sólida (MSPD, do inglês *matrix solid-phase dispersion*), microextração em fase sólida (SPME, do inglês *solid-phase microextraction*) e extração sortiva em barra de agitação (SBSE, do inglês *stir bar sorptive extraction*) (DE FARIA *et al.*, 2017; SOCAS-RODRÍGUEZ *et al.*, 2014). Por outro lado, o principal problema desses adsorventes é quanto à seletividade em amostras biológicas (sangue, plasma, alimentos, etc.) ou amostras ambientais, uma vez que apresentam elevada quantidade de macromoléculas (proteínas ou ácidos

húmicos). Assim se torna necessária uma etapa inicial de preparação da amostra para a eliminação desses interferentes, como a decomposição da matriz por procedimentos demorados (digestão por micro-ondas, via úmida ou seca, etc.) (BARBOSA *et al.*, 2015; KRUG, 2016).

A fim de solucionar esses problemas inerentes ao uso de CNT em amostras complexas, Figueiredo e colaboradores (BARBOSA *et al.*, 2015) desenvolveram os nanotubos de carbono de acesso restrito por meio de recobrimento com albumina (RACNT-BSA), que possuem a capacidade de extrair metais diretamente de matrizes proteicas sem a necessidade da etapa prévia de preparo de amostras. Os mecanismos de exclusão se baseiam na barreira química e física (DESILETS; ROUNDS; REGNIER, 1991).

A barreira química fundamenta-se na exclusão de proteínas baseado nas interações eletrostáticas repulsivas entre as proteínas da amostra e a camada albumina bovina sérica (BSA, do inglês *bovine serum albumin*) que recobre o material e simultaneamente provoca a atração eletrostática dos íons metálicos presentes na matriz (BARBOSA *et al.*, 2015; GOMES *et al.*, 2016). A barreira física é caracterizada pelo pequeno tamanho dos poros do adsorventes, pois apenas pequenas moléculas são capazes de acessar o interior dos mesmos, já que a barreira de difusão física impede que as macromoléculas consigam adentrar nesses poros (DE FARIA *et al.*, 2017; DESILETS; ROUNDS; REGNIER, 1991)..

O RACNT-BSA foi empregado como adsorvente sólido na extração direta de íons metálicos de  $\text{Cd}^{2+}$  e  $\text{Pb}^{2+}$  em soro sanguíneo humano (BARBOSA *et al.*, 2015, 2016), na extração de íons  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$  da dismutase superóxido (BALDUINO *et al.*, 2019) e apresentou uma elevada capacidade de adsorção de metais e exclusão de proteínas.

Outras aplicações na adsorção de metais, em águas residuais, (BASSYOUNI *et al.*, 2020) e até mesmo interações com metaloproteínas, foram relatadas (BALDUINO *et al.*, 2019; GOMES *et al.*, 2016). Portanto, existe um grande potencial para o uso desses materiais na extração e pré-concentração de íons ferro em soluções aquosas e amostras biológicas com uma elevada concentração proteica.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

A revisão bibliográfica versa sobre algumas proteínas e apoproteínas, CNTs, processos de funcionalização de CNTs, adsorção de metais e proteínas em CNT, materiais de acesso restrito (RAM do inglês, *restricted access media*) e os obtenção e aplicação dos RACNT-BSA.

### 2.1 ALBUMINAS

A albumina de soro é a proteína mais abundante do plasma sanguíneo, com concentração de aproximadamente  $40 \text{ g L}^{-1}$  ( $\sim 0,6 \text{ mol L}^{-1}$ ) (CURRY; BRICK; FRANKS, 1999). Essa proteína tem por funções: manutenção da pressão osmótica sanguínea, manutenção do pH do plasma, efeito antioxidante, marcador de nutrição e longevidade, transporte de fármacos, entre outras. Por ser isolada e purificada em grande escala e o fato de ser um excelente ligante a uma variedade de moléculas, fez com que a albumina fosse empregada em estudos biofísicos e bioquímicos (PONTREMOLI *et al.*, 2018).

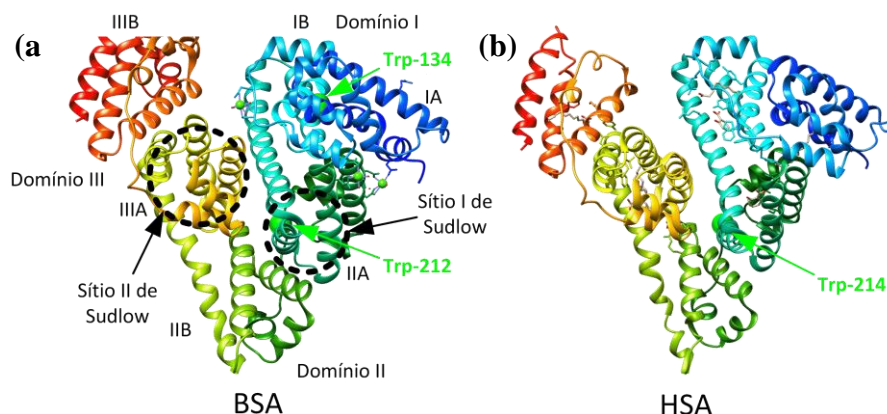
A albumina humana (HSA, do inglês *human serum albumin*) pode ser cristalizada, possibilitando pesquisas relacionadas à interação com outras proteínas e pequenas moléculas, visando entender sua função transportadora e marcadora de doenças nutricionais (HE; CARTER, 1992; LU *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2019).

Comparativamente, a BSA possui cerca de 76% de sua sequência de aminoácidos idêntica à HSA, conferindo à BSA funções similares à HSA (JR, 1995). Além disso, sua elevada estabilidade, disponibilidade, baixo custo e por ser uma proteína com composição bem definida, faz com que seja frequentemente usada como referência para quantificação de outras proteínas de peso desconhecido. Porém, as duas diferem em quantidade de resíduos de triptofano (Trp), possuindo dois resíduos denominados Trp-134 e Trp-212 na BSA, localizados nos subdomínios IB e IIA, respectivamente, enquanto a HSA contém apenas um resíduo, o Trp-214, situados no subdomínio IIA. Há também diferença na sequência de sítios N-terminais, apresentando a tríade Asp-Thr-His na BSA e Asp-Ala-His na HSA (HAN *et al.*, 2012; HE; CARTER, 1992).

A BSA consiste em um acoplamento flexível de domínios semi-independentes, com massa molecular de 66 kDa, composta de 582 resíduos de aminoácidos e três grandes domínios estruturalmente similares, denominados de I, II e III. Cada domínio contém dois subdomínios, classificados de A e B. As regiões responsáveis pelo armazenamento dos

compostos nas albuminas estão localizadas nos subdomínios IIA e IIIA, conhecidos como sítios I e II de Sudlow (Figura 1). Há 17 pontes de dissulfeto, que contribuem para manter sua estrutura terciária e que resulta em 9 rotações, as quais são rearranjos similares aos presentes na HSA (CHI *et al.*, 2018) (NAVEENRAJ; ANANDAN, 2013).

Figura 1 - (a) Representação do arcabouço proteico da BSA e (b) estrutura tridimensional da HSA



FONTE: Adaptado de (NAVEENRAJ; ANANDAN, 2013).

A BSA é amplamente empregada nos estudos de imobilização em suportes, devido à sua elevada estabilidade, disponibilidade e alta solubilidade em água (KOPAC; BOZGEYIK; YENER, 2008; KUDELSKI, 2003). Como o ponto isoelétrico (pI) da BSA está entre 4,5 e 5,0 e normalmente as condições biológicas ocorrem em pH neutro, essa proteína fica carregada negativamente, enquanto em condições ácidas, fica carregada positivamente (GOMES *et al.*, 2016). A densidade de carga superficial dos três domínios da BSA influencia em sua adsorção (MCCLELLAN; FRANCES, 2003; NAVEENRAJ; ANANDAN, 2013). Por exemplo, a ocorrência de ambos resíduos de aminoácidos carregados negativamente (ácido glutâmico e aspártico) e carregados positivamente (lisina, histidina) na BSA podem resultar interações eletrostáticas atrativas a superfícies carregadas positivamente e/ou negativamente (KUDELSKI, 2003). Portanto, a adsorção de BSA é um fenômeno fortemente dependente do pH (ALKAN *et al.*, 2006; GOMES *et al.*, 2016).

## 2.2 INTERÇÃO METAIS PROTEÍNAS

Nos próximos tópicos serão abordados a interação dos metais com peptídeos, metaloproteínas e apoproteínas.

## 2.2.1 Importância biológica dos metais

Os metais desempenham diversas funções biológicas dependendo das características químicas e de sua disponibilidade nos organismos vivos. Mesmo que sejam menos abundantes que outros elementos, são indispensáveis para diversas funções, principalmente para as proteínas.

Na composição do organismo humano, quatro elementos correspondem a 99%, sendo os átomos de hidrogênio (62,8%), oxigênio (25,4%), carbono (9,4%) e nitrogênio (1,4%). Apenas 1% é atribuído a outros elementos, destacando-se os metais, os quais são de suma importância em diversas reações que ocorrem no meio biológico (CRICHTON, 2019; LIPPARD; BERG, 1994). O quadro 1 mostra a concentração de alguns metais nos organismos de forma geral.

Quadro 1 - Concentração ( $\text{mol dm}^{-3}$ ) de metais nos Organismos.

Metal	Plasma sanguíneo	Citoplasma
Na	$10^{-1}$	$< 10^{-2}$
K	$4 \times 10^{-3}$	$\leq 3 \times 10^{-1}$
Mg	$10^{-3}$	$\approx 10^{-3}$
Ca	$10^{-3}$	$\approx 10^{-7}$
Fe	$10^{-16}$	$\approx 10^{-7}$
Zn	$10^{-9}$	$< 10^{-11}$
Cu	$10^{-12}$	$< 10^{-15}$
Mn	-	$\approx 10^{-6}$
Co	-	$< 10^{-9}$
Ni	-	$< 10^{-10}$
Mo	-	$< 10^{-7}$

FONTE: Adaptado de (ATKINS *et al.*, 2010).

A deficiência de alguns metais pode ocasionar doenças que podem levar a morte. Portanto, há necessidade de uma alimentação que forneça a quantidade requerida destes íons e para alcançar um valor ideal pode-se utilizar suplementos alimentares. O quadro 2 lista alguns metais e efeitos causados pela deficiência dos mesmos.

Quadro 2 - Doenças e sintomas causados pela deficiência de metais.

(continua)

Metal	Doenças e sintomas
Cálcio	Osteoporose e retardo no crescimento ósseo
Cobalto	Anemia perniciosa (deficiência de vitamina B12)
Cobre	Desordem de Menkes: desordens sanguíneas
Cromo	Intolerância a glicose e risco de doenças cardiovasculares
Estanho	Retardo do crescimento
Ferro	Anemia
Magnésio	Disfunções neuromusculares, cirrose hepática, deficiências diuréticas e efeitos de absorção de nutrientes

Quadro 2 - Doenças e sintomas causados pela deficiência de metais.

		(conclusão)
Metal	Doenças e sintomas	
Manganês	Retardo do crescimento	
Molibdênio	Carcinogênese nos seios e câncer no esôfago	
Níquel	Retardo do crescimento ósseo e anormalidades dos hepatócitos	
Potássio	Bulimia; anorexia nervosa e acidez renal	
Sódio	Hiponatremia, síndrome de secreção inapropriada de hormônio antidiurético	
Zinco	Retardo no crescimento, atrofia muscular, lesões na pele e perda de apetite	


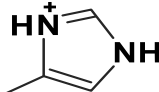


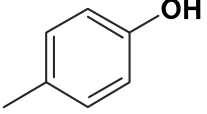

FONTE: Adaptado de (KAIM; SCHWEDERSKI; KLEIN, 2013).

### 2.2.2 Interação metais com peptídeos

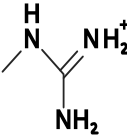

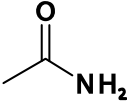
Na estrutura geral de um aminoácido, existem dois átomos doadores de pares de elétrons (N e O) separados por três ligações, conseqüentemente, esses são capazes de formar um anel quelato estável com um átomo metálico. Alguns aminoácidos possuem ainda doadores de elétrons de cadeia lateral (R), que participam da formação do complexo e podem até competir com os grupos  $\alpha$  - amino e com a carbonila da cadeia principal (NELSON; COX; HOSKINS, 2021).

No quadro 3, estão listadas as principais cadeias laterais de aminoácidos que interagem com íons metálicos, que na sua maioria são constituídos de grupamentos carbonilas e aminos.

Quadro 3 - Cadeias laterais de aminoácidos que interagem com íons metálicos.

			(continua)
Cadeia lateral	Estrutura	pKa aproximado	
Carboxilato		4	
Imidazol		6	
$\alpha$ - Amônio		6 - 8	
$\epsilon$ - Amônio		10	
Fenólico		10	
Tiol		10	

Quadro 3 - Cadeias laterais de aminoácidos que interagem metálicos.

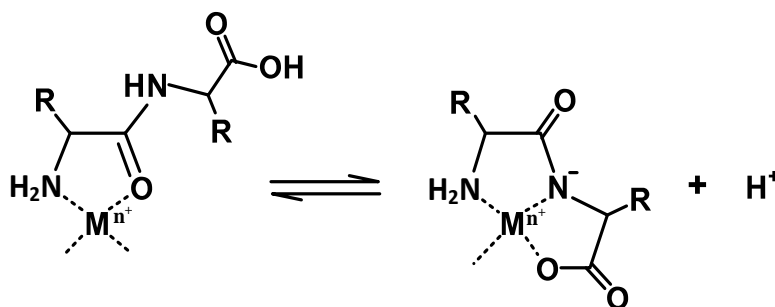
(conclusão)		
Cadeia lateral	Estrutura	pKa aproximado
Guanidino		12
Hidroxila		≥ 14
Amida		≥ 14

FONTE: Adaptado de (CHOW; GOODING, 2006).

Nota: pKa = -log Ka (acidez de uma solução)

Nos peptídeos simples que possuem cadeias laterais que não interagem com íons metálicos, a ligação com o metal pode ocorrer entre o grupo amino e oxigênio da amida ou o grupo amino e nitrogênio da amida. A figura 2 representa a reação de complexação do íon metálico - dipeptídeo.

Figura 2 - Complexação do íon metálico com um dipeptídeo com cadeias laterais não complexantes.

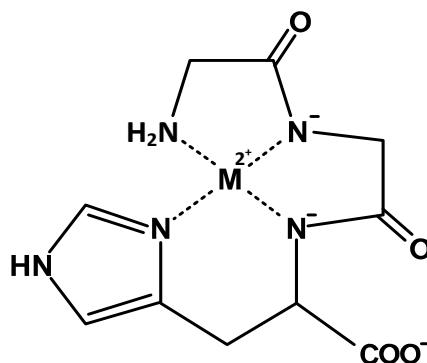


FONTE: Adaptado de (CHOW; GOODING, 2006).

A complexação envolvendo o nitrogênio do grupamento amino e da amida também permite o envolvimento com um terceiro ligante, o oxigênio da carboxila, sendo formado um complexo mais estável, como demonstrado no produto da reação acima. Importante salientar que para ocorrer a coordenação do metal com o nitrogênio da amida, é necessário que ocorra a substituição do H da ligação N – H pelo metal ( $M^{n+}$ ) formando a ligação (N –  $M^{n+}$ ). Nesta reação os íons  $H^+$  competem com o íon metálico pelo ligante, tornando assim a reação de complexação do metal pelo peptídeo dependente do pH (CHOW; GOODING, 2006).

Para peptídeos maiores, com três ou mais resíduos de aminoácidos, observa-se uma ligação significativamente mais forte entre o metal e o nitrogênio da amida ao longo da cadeia peptídica envolvida na coordenação. Na figura 3 está representada uma ligação de coordenação entre o tripeptídeo Gly-Cli-His e  $\text{Cu}^{2+}$ . Essa reação envolve a desprotonações sucessiva dos nitrogênios da amida e do nitrogênio do imidazol em pH 9-10.

Figura 3 - Complexação do íon metálico com um tripeptídeo Gly-Gly-His.



FONTE: Adaptado de (CHOW; GOODING, 2006).

Alguns fatores influenciam na afinidade do ligante por diferentes metais, dentre eles a dureza/moleza do metal, geometria de coordenação do complexo, efeito da estabilização do campo ligante e dureza/moleza de alguns sítios de coordenação da sequência de aminoácidos (HOUSECROFT, 2012).

A intensidade da complexação de um ligante com um metal pode ser mensurada tomando como base a classificação dos metais como duros, moles ou intermediários; ou ainda a classificação como ácidos e bases moles ou duros, introduzida por R. G. Person com base nas interações de ácidos (receptor de par de elétrons) e bases (doador de par de elétrons) (AYERS; PARR; PEARSON, 2006). Segundo Person, ácidos duros tendem a se ligar com bases duras e ácidos moles tendem a se ligar com bases moles. Uma regra prática geral é que cátions pequenos, que não são facilmente polarizados, são duros e formam complexos com ânions pequenos, já cátions grandes são mais facilmente polarizados e são macios (HOUSECROFT, 2012). O quadro 4 mostra a classificação de ácido e base de Lewis referente ao grau de mole, duro e intermediário, quanto aos ligantes e o metal central.

Quadro 4 - Classificação dos ácidos e bases de Lewis.

Classificação	Ligante (Base de Lewis)	Metal central (Ácido de Lewis)
Duro	F <sup>-</sup> , Cl <sup>-</sup> , H <sub>2</sub> O, ROH, R <sub>2</sub> O, [OH] <sup>-</sup> , [RO] <sup>-</sup> , [RCO <sub>2</sub> ], [CO <sub>3</sub> ] <sup>2-</sup> , [NO <sub>3</sub> ] <sup>-</sup> , [PO <sub>4</sub> ] <sup>3-</sup> , [SO <sub>4</sub> ] <sup>2-</sup> , [ClO <sub>4</sub> ], [ox] <sup>2-</sup> , NH <sub>3</sub> , RNH <sub>2</sub>	Li <sup>+</sup> , Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , Rb <sup>+</sup> , Be <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , Ca <sup>2+</sup> , Sr <sup>2+</sup> , Sn <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Al <sup>3+</sup> , Ga <sup>3+</sup> , In <sup>3+</sup> , Sc <sup>3+</sup> , Cr <sup>3+</sup> , Fe <sup>3+</sup> , Co <sup>3+</sup> , Y <sup>3+</sup> , Th <sup>4+</sup> , Pu <sup>4+</sup> , Ti <sup>4+</sup> , [VO] <sup>2+</sup> , [VO <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>
Mole	I <sup>-</sup> , H <sup>-</sup> , R <sup>-</sup> , [CN] <sup>-</sup> , CO, RNC, RSH, R <sub>2</sub> S, [RS] <sup>-</sup> , [SCN] <sup>-</sup> , R <sub>3</sub> P, R <sub>3</sub> As, R <sub>3</sub> Sb, alcanos, arenos	Tl <sup>+</sup> , Cu <sup>+</sup> , Ag <sup>+</sup> , Au <sup>+</sup> , [Hg <sub>2</sub> ] <sup>2+</sup> , Hg <sup>2+</sup> , Cd <sup>2+</sup> , Pd <sup>2+</sup> , Pt <sup>2+</sup> , Tl <sup>3+</sup>
Intermediário	Br <sup>-</sup> , [N <sub>3</sub> ] <sup>-</sup> , [SCN] <sup>-</sup> , ArNH <sub>2</sub> , [NO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup> , [SO <sub>3</sub> ] <sup>2-</sup>	Pb <sup>2+</sup> , Fe <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Os <sup>2+</sup> , Ru <sup>3+</sup> , Rh <sup>3+</sup> , Ir <sup>3+</sup>

FONTE: Adaptado de (HOUSECROFT, 2012).

Os metais duros (não polarizáveis) são altamente estáveis e formam complexos predominantemente via ligação eletrostática. A afinidade desses metais pelo ligante decresce na seguinte ordem (O > P > N > S). Portanto, estes metais se ligam preferencialmente ao carboxilato encontrado nos peptídeos, aminoácidos e a grupamentos fosfatos no DNA.

Para os metais moles (polarizáveis) ocorre uma inversão na preferência de ligação com os ligantes (S > N > P > O). Os metais moles também são considerados tóxicos, portanto, não são essenciais para os sistemas biológicos. Aminoácidos, que possuem nitrogênio, em sua cadeia lateral (histidina, lisina e arginina), ou enxofre (cisteína), se ligam preferencialmente a metais moles. Tem-se também a classe que possui características intermediárias entre duro e mole. Nesta classe estão incluídos o Pb<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> e Ni<sup>2+</sup> (CHOW; GOODING, 2006).

O grupo imidazol da histidina (His), por exemplo, é um sítio de extrema importância para ligações com zinco, cobre e outros íons, enquanto a cisteína (Cys) é o melhor ligante para ligações com metais com alta afinidade pelo enxofre. A ordem de afinidade dos metais pelo enxofre é: Hg<sup>2+</sup> ≈ Ag<sup>+</sup> >> Cu<sup>2+</sup> > Pb<sup>2+</sup> ≈ Cd<sup>2+</sup> > Zn<sup>2+</sup> >> Ca<sup>2+</sup> ≈ Mg<sup>2+</sup> (HOUSECROFT, 2012).

No quadro 5 estão apresentados alguns exemplos de peptídeos e fragmentos peptídicos que interagem com íons metálicos.

Quadro 5 - Peptídeos que interagem com íon metálicos.

Peptídeo	Sequência	Metal central	Referência
Fitoquelatina (Quelante biológico)	( $\gamma$ - GluCys) <sub>n</sub> - Gly)	Cd <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Hg <sup>2+</sup> , Ag <sup>+</sup> e As <sup>3+</sup>	(NAVARRETE <i>et al.</i> , 2019)
Glutathiona (Quelante biológico)	( $\gamma$ - GluCysGly)	Cd <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Hg <sup>2+</sup> , Ag <sup>+</sup> e As <sup>3+</sup>	(NAVARRETE <i>et al.</i> , 2019)
Oxitocina (Peptídeo hormonal envolvido no ciclo reprodutivo)	Cys-Tyr-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly	K <sup>+</sup> , Na <sup>+</sup> , Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> e Zn <sup>2+</sup>	(AVANTI <i>et al.</i> , 2011)
Fragmentos peptídeos do Prion (presente no tecido nervoso dos mamíferos)	(Pro-His-Gly-Gly-Gly-Trp-Gly-Gln) <sub>n</sub> His-Gly-Gly-Gly)	Cu <sup>2+</sup>	(CSIRE <i>et al.</i> , 2020)

FONTE: Do autor.

### 2.2.3 Metaloproteínas

Nos sistemas biológicos, as proteínas são encontradas intimamente associadas a um cofator metálico para desempenhar a sua função e podem ser chamadas de metaloproteínas. Se essa metaloproteína catalisa alguma reação é chamada de metaloenzimas (LIPPARD; BERG, 1994). É importante destacar, que essa associação também é favorecida de forma negativa, por exemplo: alguns metais como chumbo, mercúrio e cádmio, são tóxicos, pois interferem na função das metaloenzimas e em outras vias bioquímicas (SANGI, 2004).

As metaloenzimas são classificadas pela União internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB, do inglês: *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*), de acordo com a função biológica que desempenham. De forma geral, as enzimas são classificadas em seis classes: óxido-redutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases. No quadro 6, estão representadas essa classificação quanto à função dessas metaloenzimas.

Quadro 6 - Classificação das metaloenzimas pela IUBMB.

(continua)

Classe	Nome	Função	Exemplo
1	Óxido-redutases	Catalisar reações de óxido-redução	Catalase, citocromo oxidase, tirosinase, peroxidases
2	Transferases	Transferir grupos funcionais entre moléculas	Alanina aminotransferase, quinase
3	Hidrolases	Catalisar a reação de hidrólise com a clivagem de ligação C - O, C - N, O - P ou C - S	Fosfatase ácida púrpura, peptidases, urease

Quadro 6 - Classificação das metaloenzimas pela IUBMB.

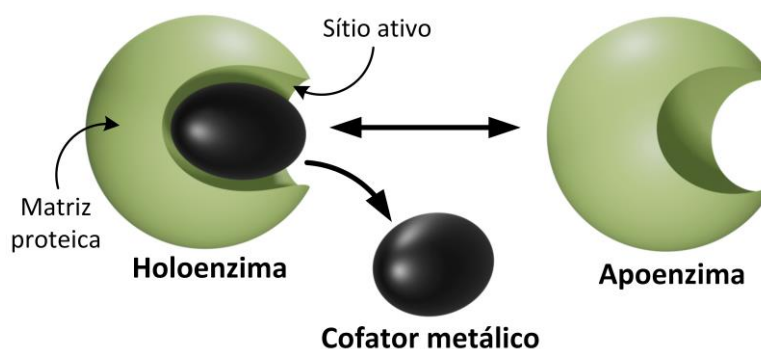
(conclusão)			
Classe	Nome	Função	Exemplo
4	Liases	Adicionar ou remover água, amônia ou dióxido de carbono	Fumarase, Glutamato descarboxilases, anidrase carbônica
5	Isomerases	Catalisar a interconversão entre isômeros	Fosfoglicomutase
6	Ligases	Catalisar a ligação entre duas moléculas	DNA ligase

FONTE: Adaptado de (LIPPARD; BERG, 1994).

### 2.2.3.1 Apoproteínas

A Figura 4 ilustra as partes mais importantes de um sistema /enzima. O sítio ativo é uma região da enzima de elevada importância, pois é constituído de um arranjo de grupos presentes em cadeias laterais de certas enzimas, que ligam o substrato por ligações não-covalentes. Outra região que se destaca é o sítio alostérico, afastado do sítio ativo. No sítio alostérico, moléculas pequenas se ligam e causam alterações na conformação enzimática, que afetam o sítio ativo, aumentando ou reduzindo a atividade. Portanto, a maioria das enzimas necessita de moléculas orgânicas ou inorgânicas pequenas, essenciais para a atividade, que são denominadas como coenzimas ou cofatores (MOTTA, 2006).

Figura 4 - Estrutura proteica, holoenzima, cofator e apoenzima.



Fonte: Adaptado de (DAVID L. NELSON, 2014).

Os cofatores são pequenas moléculas orgânicas ou inorgânicas, fraca ou fortemente ligados às enzimas, que podem ser necessários para a função catalítica da enzima. Estes cofatores não estão ligados permanentemente à enzima, mas na ausência deles, a enzima é inativa. O quadro 7 mostra algumas metaloenzimas e seus respectivos cofatores metálicos (NELSON; COX; HOSKINS, 2021).

Quadro 7 - Metaloproteínas e seus respectivos cofatores metálicos.

Proteína (s)	Metal (s)
Catalase, Citocromo C, Citocromo P-450, Ferredoxina, Ferritina, Hemeritina, Hemoglobina, Lactoferrina, Mioglobina, Nitrogenase, Peroxidase, Ribonucleotídeo redutase, Rubredoxina, Protocatecuato-3,4-dioxigenase, Superóxido dismutase	Ferro
Ascorbato oxidase, Azulina, Citocromo oxidase, Galactose oxidase, Hemicianina, Nitrito redutase, Plastocianina, Superóxido dismutase	Cobre
Anidrase carbônica, Carboxipeptidases, Superóxido dismutase	Zinco
Arginase, Superóxido dismutase	Manganês
Glicose-6-fosfatase, Hexoquinase, Piruvato quinase	Magnésio
Urease	Níquel
Nitrogenase	Molibdênio
Glutaciona peroxidase	Selênio
Piruvato quinase	Potássio

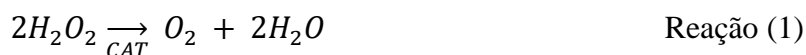
FONTE: Adaptado de (LIPPARD; BERG, 1994).

Algumas enzimas, associadas aos metais, são denominadas de holoenzimas e são altamente reativas em comparação às formas desprovidas dos mesmos que são denominadas apoenzimas (NELSON; COX; HOSKINS, 2021).

Dentre as diversas metaloproteínas citadas no quadro 7, a enzima escolhida, para o presente estudo, na produção de apoproteínas, foi a catalase, devido sua importância para os organismos vivos. No próximo tópico será detalhado a função dessa enzima.

### 2.2.3.2 Catalase (CAT)

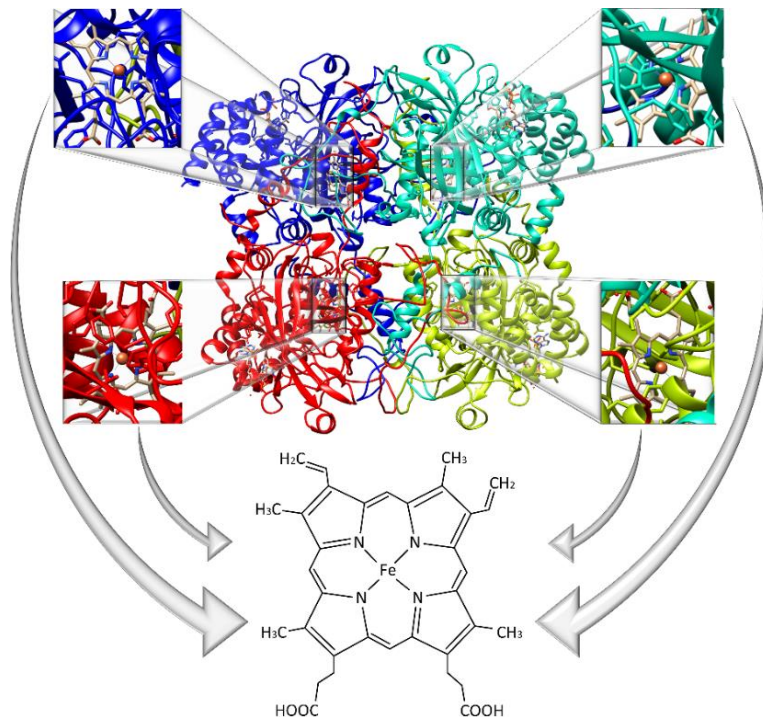
A CAT tem por função catalisar a redução do peróxido de hidrogênio a água e oxigênio (Reação 1).



Esta enzima normalmente é encontrada no sangue, medula óssea, mucosas, rins e fígado e pode converter até 6 milhões de moléculas de  $H_2O_2$ . O tipo mais comum de CAT é um tetrâmero com cerca de 240 kDa de massa molecular, possuindo quatro cadeias polipeptídicas idênticas. Nessa metaloproteína, cada cadeia polipeptídica com cerca de 60 kDa, possui um anel de protoporfirina complexado com o  $Fe^{3+}$  atuando como centro redox (NICHOLLS, 2012). Na figura 5, está representado a estrutura tridimensional da

CAT hémica e as aproximações são as regiões onde se encontram os anéis de protoporfirina.

Figura 5 - Estrutura tridimensional da enzima CAT e os quatro grupos heme.



FONTE: Retirado do banco de dados de proteínas (PDB) (2018). Código: 1th3.

Nota: O Fe está sempre sob a forma férrica e aparece na aproximação no anel de protoporfirina).

A CAT tem por função atuar como antioxidante, isto é, substância capaz de atrasar ou inibir a oxidação de um substrato. O papel dos antioxidantes é proteger as células saudáveis do organismo contra a ação oxidante dos radicais livres. Sendo tóxico para as células, o peróxido tem que ser rapidamente convertido numa espécie química que não cause danos ao organismo (NICHOLLS, 2012).

### 2.3 NANOTUBOS DE CARBONOS E SUAS PROPRIEDADES

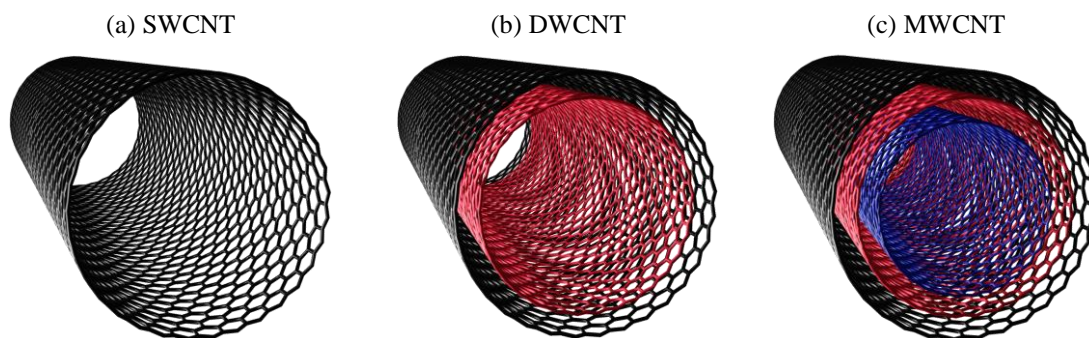
Os CNT foram descobertos pelo cientista japonês Sumio Iijima. São descritos como uma estrutura cilíndrica e oca feita de uma camada circular de carbonos ligados entre si em configuração  $sp^2$  (IJIMA, 1991). Estes nanomateriais possuem propriedades eletrônicas, mecânicas, térmicas e químicas e têm despertado interesse da comunidade científica desde então (RATHINAVEL; PRIYADHARSHINI; PANDA, 2021). O seu

diâmetro é da ordem de poucos nanômetros e seu comprimento pode chegar a vários micrômetros, sendo que os extremos desses tubos ficam fechados por estruturas tipo fulereno (FORRÓ; SCHÖNENBERGER, 2001).

### 2.3.1 Tipos de nanotubos de carbono

Os nanotubos podem ser classificados de acordo com o diâmetro, comprimento e número de camadas de grafenos enroladas cilindricamente e podem ser divididos em 3 tipos. Na Figura 6 estão representadas os CNT quanto ao número de paredes.

Figura 6 -Tipos de CNT, em (a) nanotubos de carbono de parede simples, (b) paredes duplas e (c) paredes múltiplas.



FONTE: Do autor.

Os nanotubos de carbono de parede simples (SWCNT, do inglês *single-walled carbon nanotubes*) descritos na literatura pela primeira vez em 1993, são constituídos por apenas uma camada de folha de grafeno enroladas cilindricamente e possuem diâmetro de 1 a 2 nanômetros (IJIMA; ICHIHASHI, 1993). Dependendo do método de preparação, o comprimento e a pureza, esses materiais podem variar de acordo com o tipo de catalizador empregado e o controle da pressão atmosférica (RATHINAVEL; PRIYADHARSHINI; PANDA, 2021). A Figura 6a representa a superfície interna e externa dos SWCNT.

Os nanotubos de carbono de paredes dupla (DWCNT, do inglês *double-walled carbon nanotubes*), são constituídos por duas camadas de folhas de grafeno enroladas cilindricamente. O diâmetro do tubo externo varia de 2 a 4 nanômetros e o diâmetro do tubo interno de 1 a 3 nanômetros. A figura 6b representa o tubo dos DWCNT.

Os nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT, do inglês *multi-walled carbon nanotubes*) são constituídos por 3 ou mais camadas de folhas de grafenos. O

diâmetro pode variar de 2 a 50 nanômetro, dependendo do número de paredes. O raio da camada interna é aproximadamente 0,34 nanômetros e a distância entre as camadas podem alcançar até 2 nanômetros (RATHINAVEL; PRIYADHARSHINI; PANDA, 2021). A Figura 6c representa as várias camadas de folhas de grafenos enroladas dos MWCNT. Neste trabalho, utilizou-se como precursor para a síntese dos materiais adsorventes o MWCNT.

### 2.3.2 Purificação e funcionalização dos CNT

Nos próximos tópicos foi discutida a diferença entre a purificação e funcionalização dos CNT.

#### 2.3.2.1 Purificação

A purificação tem por objetivo eliminar impurezas dos CNT após o processo de síntese. Essas impurezas podem ser carbono amorfo, CNT com diâmetros menores, formas alótropas como fulereno e grafite. Vale destacar também as impurezas relacionadas ao processo de síntese dos CNT como as partículas catalizadoras a base de metais como (Fe, Ni, Co entre outros) (ROMANOV *et al.*, 2020).

Para eliminação das impurezas dos CNT, são descritos na literatura dois métodos de purificação (físico e químico). O método físico se baseia nas variações de tamanho entre os CNT e outras impurezas como fulereno, folhas de grafenos ou CNT de outros tamanhos. Normalmente são empregados a separação magnética e sedimentação (HOU; LIU; CHENG, 2008). Importante ressaltar que a purificação física tem a vantagem de não comprometer a integridade estrutural dos CNT, porém a desvantagem está na ineficiência da eliminação de impurezas como catalisadores (SANKARARAMAKRISHNAN; GUPTA; VIDYARTHI, 2014).

O método de purificação química pode ser empregado, principalmente de duas maneiras: via úmida e seca. Na condição úmida, empregam-se oxidantes fortes como ácidos concentrados ( $\text{HNO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), oxidantes ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{KMnO}_4$ ) ou misturas, e na condição seca utilizam-se gases como  $\text{O}_2$ ,  $\text{O}_3$  e plasma. A vantagem da purificação química está na eficiência de eliminação de impurezas, porém pode se tornar desvantajosa se as taxas de concentração dos ácidos não forem devidamente controladas (PATOLE *et al.*, 2008). Dessa forma, além de eliminar essas impurezas, podem causar

danos morfológicos irreversíveis à superfície desses materiais, tais como imperfeições (defeitos ou buracos) e até eliminação de paredes dos CNT (RATHINAVEL; PRIYADHARSHINI; PANDA, 2021).

### 2.3.2.2 Funcionalização

A funcionalização dos CNT tem sido vista como uma forma de explorar seu potencial em diversas aplicações tais como na nanotecnologia, química, engenharia de superfície, compósitos, armazenamento de energia, eletrônica, biomedicina e nanomedicina, entre outras (RATHINAVEL; PRIYADHARSHINI; PANDA, 2021). Devido à natureza química de hidrofobicidade dos CNT, estes possuem uma elevada capacidade de se aglomerarem devido as forças de Van der Waals e, conseqüentemente, uma baixa dispersão em solução aquosa (LAVAGNA *et al.*, 2021). Assim, a funcionalização é uma boa estratégia para facilitar a dispersão desses materiais em meio aquoso, diminuindo assim o comportamento de agregação entre os CNT (SHARMA *et al.*, 2016). Esses nanomateriais, funcionalizados, podem ser utilizados de forma a facilitar a interação com diversas moléculas orgânicas, inorgânicas, proteínas, surfactantes, biopolímeros, entre outros (RATHINAVEL; PRIYADHARSHINI; PANDA, 2021; SHARMA *et al.*, 2016).

A funcionalização pode ser dividida em duas categorias: covalente ou química e não covalente ou física. A funcionalização covalente consiste em utilizar métodos que fazem com que os átomos de carbono dos CNT reajam quimicamente com agentes oxidantes como soluções aquosas de ácido nítrico, sulfúrico e peróxido de hidrogênio ou misturas de ácidos. A consequência dessa reação é a abertura das extremidades e a formação dos defeitos estruturais nas paredes dos CNT e como produto final, obtém-se fragmentos de comprimentos menores, cujas extremidades e paredes laterais apresentam grupos funcionais oxigenados, principalmente, carbonilas (C=O), ácidos carboxílicos (O-C=O), hidroxilas (C-OH), fenólicos, entre outros (HOANG *et al.*, 2022; LAVAGNA *et al.*, 2021).

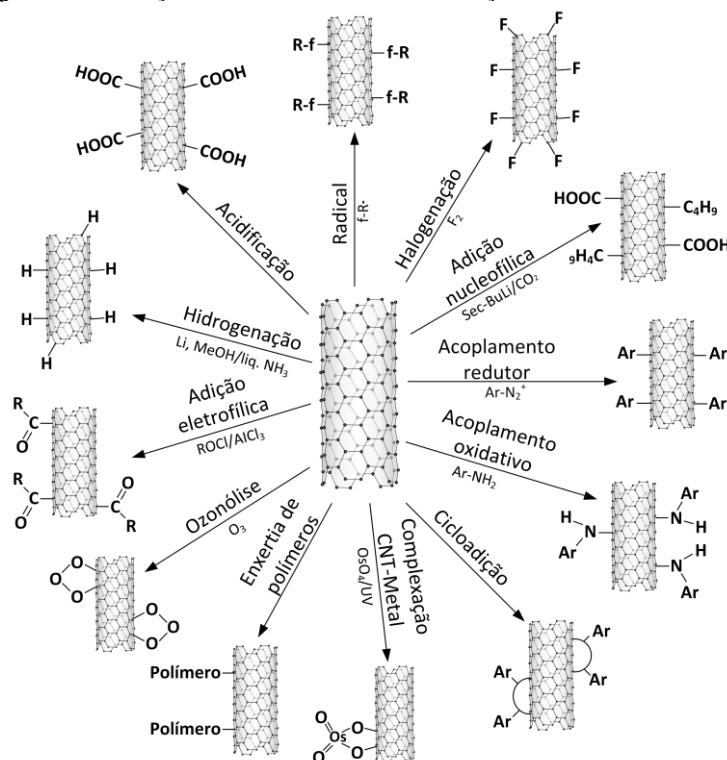
Ressalta-se que os grupos funcionais, gerados na superfície dos CNT, dependem de vários fatores, como a escolha dos agentes oxidantes, concentração, temperatura, tempo de contato e aplicação desejada (ZHANG *et al.*, 2003). Esse procedimento é o mais comum no estudo da química de modificação estrutural dos CNT, mas uma dificuldade inerente é a introdução controlada e de forma distribuída de determinados grupos

funcionais oxigenados, pois a oxidação pode danificar, de forma irreversível, a estrutura dos CNT, resultando em defeitos, encurtamento de tubos, desaparecimento de CNT de diâmetros menores, perda de material e pode ocorrer um efeito antagônico nas propriedades elétricas e térmicas desses materiais (ZHANG *et al.*, 2003).

A outra categoria é a funcionalização não covalente, a qual se baseia na utilização de moléculas que são aderidas em sua superfície por fisissorção. A vantagem desse método é não causar modificações nas ligações químicas e defeitos estruturais nos CNT. Alguns exemplos são o uso de surfactantes polímeros sintéticos e biomoléculas (proteínas, enzimas, entre outros) (SHARMA *et al.*, 2016).

De acordo com a literatura, há uma variedade de métodos de funcionalização, as quais dependem da aplicação desejada. Na Figura 7 está representado alguns dos processos mais estudados.

Figura 7 - Ilustração das diferentes funcionalizações dos CNT.



FONTE: Adaptado de (BANERJEE; HEMRAJ-BENNY; WONG, 2005).

Neste trabalho foram empregados os dois métodos de funcionalização. A covalente, na qual foi utilizado uma solução aquosa de ácido nítrico e a funcionalização não covalente, na qual foi utilizada uma solução de BSA. Os estudos relacionados aos mecanismos de interação entre esses dois métodos serão discutidos mais à frente.

### 2.3.3 Aplicação dos CNT

Devido às diversas aplicações dos CNT, serão abordados com mais detalhes a utilização dos mesmos com analitos inorgânicos, como metais, e macromoléculas como proteínas e enzimas.

#### 2.3.3.1 Aplicação de CNT na adsorção de metais

Devido à presença de uma variedade de metais presentes no meio ambiente em decorrência do descarte inadequado das atividades industriais (mineração, siderurgia, têxtil, refino de petróleo, defensivos, tintas, pigmentos, entre outros), os CNT possuem um elevado potencial na aplicação como adsorventes sólidos na extração de íons metálicos em meio aquoso (BASSYOUNI *et al.*, 2020; HOANG *et al.*, 2022; OUNI; RAMAZANI; TAGHAVI FARDOOD, 2019; VERMA; BALOMAJUMDER, 2020). No quadro 8 estão representados alguns trabalhos empregando os CNT em sua forma pura (sem modificação química ou física), funcionalizado com modificações químicas (covalente) e físicas (não covalente).

Quadro 8 - Aplicação dos CNT na adsorção de íons metálicos em meio aquoso.

(continua)

Adsorvato	Adsorvente	$Q_{\text{máx}}$ ( $\text{mg g}^{-1}$ )	Condições experimentais	Referência
Pb (II)	MWCNT -Ox	100	Temp. = 25 °C, Conc. ads = 200 mg/L, $C_0$ = 10-60 mg/L, pH = 6	(QUYEN <i>et al.</i> , 2018)
	MWCNT-NCO	196	Temp. = 25 °C, Conc. ads = 10 mg/L, $C_0$ = 5 mg/L, pH = 6	(OUNI <i>et al.</i> , 2016)
Cd (II)	MWCNT	405	Temp. = 55 °C, $C_0$ = 150 mg/L, pH = 8	(OBAYOMI <i>et al.</i> , 2020)
	MWCNT -COOH	213	Temp. = 45 °C, Conc. ads = 20 mg/L, $C_0$ = 50 mg/L, pH = 8-9	(ALIMOHAMMADY <i>et al.</i> , 2017)
Zn (II)	MWCNT func.	1,05	Temp. = 50 °C, Conc. ads = 1,1 mg/L, $C_0$ = 0,09 mg/L, pH = 10	(PARK <i>et al.</i> , 2016)
	MWCNT	156	Temp. = 25 °C, Conc. ads = 400 mg/L, $C_0$ = 100 mg/L, pH = 5	(MOOSA; RIDHA; HUSSIEN, 2016)

Quadro 8 - Aplicação dos CNT na adsorção de íons metálicos em meio aquoso.

(conclusão)

Adsorvato	Adsorvente	Q <sub>máx</sub> (mg g <sup>-1</sup> )	Condições experimentais	Referência
Hg (II)	MWCNT func. 3-amino-pirazol	112	Temp. = 25 °C, Conc. ads = 400 mg/L, C <sub>0</sub> = 150 mg/L, pH = 7,7	(ALIMOHAMMADY <i>et al.</i> , 2018)
	MWCNT	71	Temp. = 20 °C, conc. ads = 500 mg/L, C <sub>0</sub> = 0,01-0,5 mg/L, pH = 4-5	(ZHANG; YIN; LIU, 2017)
As (V)	MWCNT func. (C <sub>2</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> ) revestido Fe <sup>3+</sup> /Fe <sup>2+</sup>	25	Temp. = 45 °C, Conc. ads = 100 mg/L, C <sub>0</sub> = 0,05-4 mg/L, pH = 3-5	(VELIČKOVIĆ <i>et al.</i> , 2012)
	MWCNT decorado oxido Ce-Fe e surfactante	31	Temp. = 25 °C, Conc. ads = 200 mg/L, C <sub>0</sub> = 1-20 mg/L, pH = 3	(BANDARU <i>et al.</i> , 2013)
Cu (II)	MWCNT tratado com quitosana	120	Temp. = 25 °C, Conc. ads = 800 mg/L, C <sub>0</sub> = 50 mg/L, pH = 7	(TOFIGHY; MOHAMMADI, 2016)
	MWCNT dopado com Ag	58	Temp. = 40 °C, Conc. ads = 50 mg/L, C <sub>0</sub> = 10-100 mg/L, pH = 6	(VENKATA RAMANA; YU; SESHIAIAH, 2013)
Co (II)	MWCNT magnético sulfanados	9	Temp. = 25°C, Conc. ads = 300 mg/L, C <sub>0</sub> = 0,5-20 mg/L, pH = 10	(YANG <i>et al.</i> , 2015)
	MWCNT-hidroxiapatita	16	Temp. = 20°C, Conc. ads = 600 mg/L, C <sub>0</sub> = 6 mg/L, pH = 8	(LIU <i>et al.</i> , 2013)
	MWCNT magnético	14	Temp. = 20°C, C <sub>0</sub> = 5-25 mg/L, pH = 1-5	(BAYAZIT; KERKEZ, 2014)
Cr (VI)	MWCNT func.	6,33	Temp. = 25°C, Conc. ads = 20-60 mg/L, C <sub>0</sub> = 5 mg/L, pH = 3	(HOSSINI <i>et al.</i> , 2014)
Ni (II)	CNT-PAMAN	3900	Temp. = 25°C, Conc. ads = 100 mg/L, C <sub>0</sub> = 100 mg/L, pH = 7	(HAYATI <i>et al.</i> , 2016)
	MWCNT Ox - PPy	409	Temp. = 30°C, Conc. ads = 60 mg/L, C <sub>0</sub> = 100 mg/L, pH = 6	(KANTHAPAZHAM; AYYAVU; MAHENDIRADAS, 2015)

FONTE: Adaptado de (HOANG *et al.*, 2022).LEGENDA: Q<sub>máx</sub> é a capacidade adsorptiva máxima (mg. g<sup>-1</sup>), Temp. é a temperatura, C<sub>0</sub> é a concentração inicial de adsorvato em mg. L<sup>-1</sup> e Conc. ads. é a concentração de adsorvente em mg. L<sup>-1</sup>.

Na química analítica, esses materiais são utilizados na construção de sensores eletroquímicos (biossensores) e aplicados como sorventes sólidos para a análise de diferentes analitos em uma variedade de matrizes complexas (ambiental, biológicas e

alimentos) (CAMPOS DO LAGO *et al.*, 2020; DE FARIA *et al.*, 2017; FRUGERI *et al.*, 2020; HERRERO-LATORRE *et al.*, 2018; ISLAM *et al.*, 2019; LI; SHI, 2019; SOCAS-RODRÍGUEZ *et al.*, 2017). A baixa resistência à difusão, elevada capacidade adsorptiva e rápida sorção, são características fundamentais para esses nanomateriais desempenharem um papel importante na extração e pré concentração de analitos (orgânicos e inorgânicos) (DE FARIA *et al.*, 2017; ISLAM *et al.*, 2019; SOCAS-RODRÍGUEZ *et al.*, 2017).

Suas aplicações se baseiam no desenvolvimento de diversos métodos de extração, incluindo extração em fase sólida (SPE, do inglês, *Solid Phase Extraction*), microextração em fase sólida (SPME, do inglês, *Solid Phase Microextraction*), extração em fase sólida dispersiva (dSPE), microextração em fase sólida dispersiva ( $\mu$ dSPE, do inglês *micro Dispersive solid-phase microextraction*), extração em fase sólida dispersiva com barra magnética (m-dSPE, do inglês *Magnetic dispersive solid-phase extraction*), dispersão de matriz em fase sólida (MSPD, do inglês *Matrix solid-phase dispersion*), extração sortiva em barra de agitação (SBSE, do inglês *Stir bar sorptive extraction*) e microextração em fase líquida (LPME, do inglês *Liquid-phase microextraction*). No quadro 9 estão representadas algumas aplicações desses sorventes sólidos na extração e pré concentração de metais em diferentes matrizes complexas.

Quadro 9 - Aplicação dos CNT utilizados como sorventes em matrizes complexas.

(continua)

Íon metálico	CNT	Amostra	Tipo extração	Técnica	LD	Referência
Pb (II)	MWCNT-MnO <sub>2</sub>	Cabelo humano e água	SPE	ETAAS	4,4x10 <sup>-3</sup> µg/L	(YANG <i>et al.</i> , 2011)
Cd (II)	MWCNT/COCl	Frações proteicas de soro	SPE	ETAAS	0,01-0,0035 µg/L	(ACOSTA <i>et al.</i> , 2013)
As (II), (III),(IV)	MWCNT	Cosméticos	$\mu$ -SPE	ICP-AES	0,3-4,08 µg/L	(ALQADAMI <i>et al.</i> , 2013)
Hg (II)	MWCNT ox	Folhas de tabaco	SPE	AAS	3,69x10 <sup>-3</sup> µg/L	(EL-SHEIKH <i>et al.</i> , 2011)
Cu (II)	MWCNT/dodecil salicilaldoxima	Solo e água mineral	SPE	FAAS	4,1-4,8 µg/L	(TOBIASZ <i>et al.</i> , 2012)
Cr (III) e (VI)	MWCNT ox	Sedimento de lagos	SPE	FAAS	288 µg/Kg	(EL-SHEIKH <i>et al.</i> , 2013)
Co (II)	MWCNT	Água mineral	dSPE	AAS	-	(PYRZYŃSKA; BYSTRZEJEWSKI, 2010)
Au (III)	MWCNT-COOH	Água destilada, torneira e rio	SPE	FAAS	0,041 µg/L	(EBRAHIMZADEH <i>et al.</i> , 2013)

Quadro 9 - Aplicação dos CNT utilizados como sorventes em matrizes complexas.

						(conclusão)
Íon metálico	CNT	Amostra	Tipo extração	Técnica	LD	Referência
Fe (II) e Fe (III)	SWCNT	Farinha de trigo e solo	SPE	FAAS	2,12-4,08 µg/L	(SOYLAK; UNSAL, 2010)
Zn (II)	MWCNT-PAN	Cabelo humano	SPE	FAAS	7,0x10 <sup>-5</sup> µg/L	(TAJIK; TAHER, 2011)
Ni (II)	MWCNT, MWCNT ox e MWCNT-Alanina	Lodo e sedimentos de lago	SPE	ETAAS	0,03-0,01 µg/L	(SAVIO <i>et al.</i> , 2011)
Mn (II)	MWCNT	Água de torneira e poço artesiano	SPE	FAAS	0,058 µg/L	(AFZALI <i>et al.</i> , 2012)
Bi (II)	MWCNT/[BMIm] ] [PF <sub>6</sub> ]	Água de rios	SPE	FAAS	2,3 µg/L	(POURREZA; SHEIKHNAJDI, 2012)
Se (IV)	MWCNT-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Água de torneira e solos	dSPE	HG-AFS	0,013 µg/L	(WANG <i>et al.</i> , 2013)
Sn (II)	MWCNT	Água mineral e lagos	SPE	ETAAS	0,013 µg/L	(COSTA <i>et al.</i> , 2011)

FONTE: Adaptado de (SOCAS-RODRÍGUEZ *et al.*, 2014).

LEGENDA: MWCNT (Nanotubos de carbono de paredes múltiplas), ox. (oxidado), SPE (Extração em fase sólida), µ-SPE (Micro extração em fase sólida), dSPE (Extração em fase sólida dispersiva), ETAAS (Espectroscopia por absorção atômica por atomização eletrotérmica), AAS (Espectroscopia por absorção atômica), ICP-AES (Espectroscopia de emissão atômica por plasma acoplado indutivamente), FAAS (Espectroscopia por absorção atômica por chama), HG-AFS (Espectrometria de fluorescência atômica com geração de hidretos), PAN (1-(2-piridilazo)-2-naftol, [BMIm][PF<sub>6</sub>] (hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio).

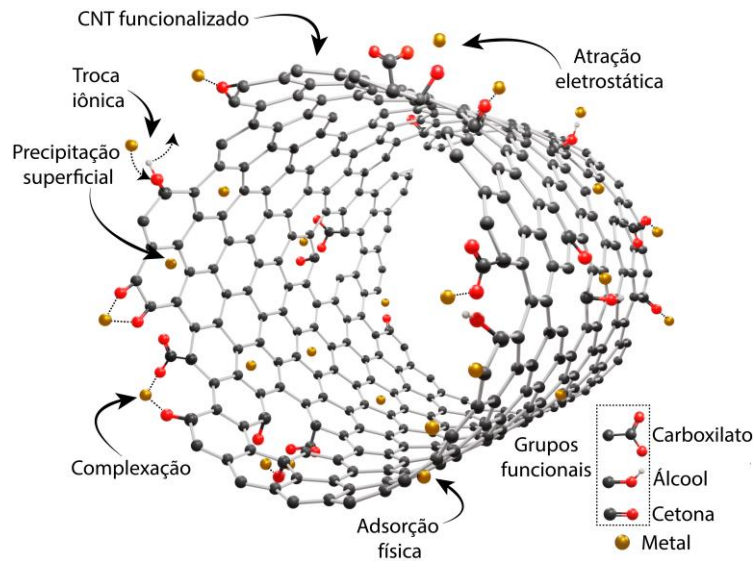
### 2.3.3.2 Mecanismos de interação entre CNT e metais

A adsorção de íons metálicos nos CNT aumenta significativamente após processos de funcionalização ácida, pois as extremidades dos CNT sofrem aberturas e rupturas e, nesses locais, há formação de grupos funcionais oxigenados com carga negativa e, por interações eletrostáticas atrativas, os íons metálicos são adsorvidos na superfície dos CNT (GUPTA *et al.*, 2016). Além disso, essa modificação favorece um aumento na dispersividade em solução aquosa, área superficial e capacidade adsortiva (IHSANULLAH *et al.*, 2016; LAVAGNA *et al.*, 2021; SRIVASTAVA, 2013).

A maior dificuldade entre pesquisadores que estudam os mecanismos de sorção entre íons metálicos e CNT é a compreensão do tipo de interação que ocorre. Em geral, as interações ocorridas, entre os grupos funcionais e metais, dependem de vários fatores como: pH da solução aquosa, força iônica, temperatura, tempo de contato, quantidade de

adsorvente e a natureza química do metal (HOANG *et al.*, 2022). Geralmente, os mecanismos mais citados na literatura são os de quimissorção (troca iônica, complexação e precipitação superficial) e os de fisissorção (interação eletrostática e adsorção física) (DUAN *et al.*, 2020; YANG *et al.*, 2019). Na Figura 8 estão representados esses mecanismos.

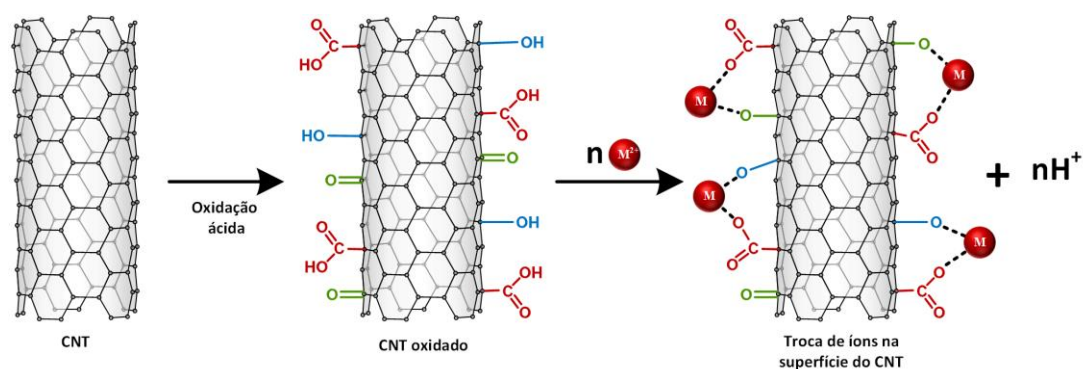
Figura 8- Mecanismos de interação entre os CNT e os metais.



FONTE: Do autor

Observe que vários mecanismos podem ocorrer na superfície dos CNT ao mesmo tempo. Por exemplo, a troca iônica, interação eletrostática e complexação podem estar intimamente relacionadas aos grupos funcionais da superfície gerados pela funcionalização. Nos CNT, os grupos funcionais oxigenados, oriundos da funcionalização ácida em sua superfície, interagem predominantemente por interação química com os íons metálicos (GUPTA *et al.*, 2016). De acordo com a representação da Figura 9, os íons metálicos, quando adsorvidos na superfície dos CNT, ocasionam a liberação de íons  $H^+$  em solução e, conseqüentemente, há uma diminuição do valor do pH. Este fenômeno está totalmente relacionado com a concentração dos íons metálicos, pois quanto mais íons são adsorvidos na superfície dos CNT, maior é a redução do pH.

Figura 9 - Esquema do mecanismo de sorção de íons metálicos bivalentes na superfície dos CNT.



FONTE: Adaptado de (GUPTA *et al.*, 2016).

Vale ressaltar que não há um consenso entre os pesquisadores quanto ao processo de funcionalização, pois a maioria dos trabalhos relatam que os grupos funcionais na superfície dos CNT, são de extrema importância para a adsorção dos íons metálicos e, com isso, os CNT oxidados são mais eficientes que os CNT sem nenhum tratamento químico (DUAN *et al.*, 2020; FU; WANG, 2011; GUPTA *et al.*, 2016; IHSANULLAH *et al.*, 2015, 2016; REN *et al.*, 2011). Outros autores sugerem o oposto (HOANG *et al.*, 2022; PILLAY; CUKROWSKA; COVILLE, 2009; WANG *et al.*, 2007). Portanto, a capacidade adsorptiva dos CNT é dependente do método de produção e, consequentemente, das suas propriedades físicas e químicas relacionadas nessa revisão.

### 2.3.3.3 Aplicações dos CNT e toxicidade

Além das aplicações citadas anteriormente, os CNT têm despertado interesse de áreas das ciências, como área médica e farmacêutica. Contudo, há uma preocupação dos cientistas quanto a sua toxicidade, devido sua produção em massa.

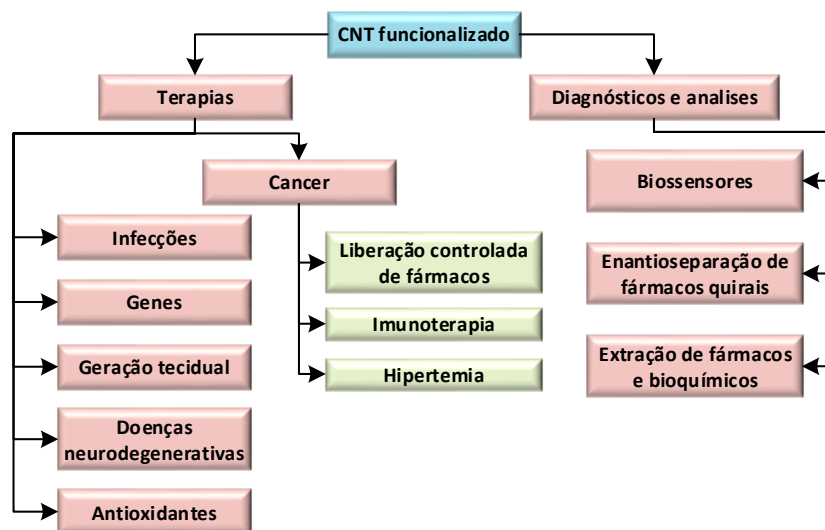
Com isso, têm sido conduzidos vários estudos *in vitro* e *in vivo* relacionados a esse assunto (KOLOSNAJ; SZWARC; MOUSSA, 2007; KOLOSNAJ-TABI; SZWARC; MOUSS, 2012). A grande preocupação está relacionada aos potenciais impactos ambientais, pois essas nanopartículas apresentam um risco de exposição ambiental, podendo causar sérios riscos à saúde dos seres vivos (citotoxicidade, alergênicos e mutagênicos) (BARBARINO; GIORDANO, 2021; JAMPILEK; KRALOVA, 2021).

Vários autores afirmam que a toxicidade dos CNT *in vivo* é devida a fatores como: o tipo de CNT (SWCNT ou MWCNT), método de síntese e impurezas, pois para síntese utilizam-se catalisadores específicos a base de metais, métodos de purificação,

comprimento e propriedades de agregação (FARGHALI *et al.*, 2017; KOLOSNAJ; SZWARC; MOUSSA, 2007; LAVAGNA *et al.*, 2021; SALEEMI *et al.*, 2021).

Na figura 10 estão representadas algumas aplicações médicas e farmacêutica desses materiais.

Figura 10 - Aplicações médicas e farmacêuticas dos CNT.



FONTE: Adaptado de (SHARMA *et al.*, 2016).

#### 2.3.3.4 Aplicação de CNT funcionalizados com macromoléculas

Os CNT têm aplicações potenciais em várias áreas em que as funcionalizações dos mesmos, permitem a sua utilização em sistemas biológicos distintos (HOANG *et al.*, 2022; LAVAGNA *et al.*, 2021; SOCAS-RODRÍGUEZ *et al.*, 2014).

Nessa perspectiva, pesquisadores estudaram a interação de CNT com diversos tipos de moléculas complexas. O quadro 10 descreve trabalhos reportados na literatura nos últimos anos.

Quadro 10 - Aplicação dos CNT com macromoléculas

(continua)

CNT	Alvo	Aplicação	Referência
MWCNT, MWCNT-COOH e MWCNT-PEG	BSA e IgG	Toxicidade e biocompatibilidade em meio biológico	(ZHANG <i>et al.</i> , 2019)
SWCNT, SWCNT-OH e SWCNT-NH <sub>2</sub>	HSA	Estudo de interação e toxicidade	(LU <i>et al.</i> , 2018)
MWCNT	DNA	Estudo de conformação e estabilidade	(TARDANI <i>et al.</i> , 2020)

Quadro 10 - Aplicação dos CNT com macromoléculas

(conclusão)

CNT	Alvo	Aplicação	Referência
MWCNT e MWCNT-NH <sub>2</sub>	Lisozima	Estudo cinético de adsorção e otimização	(ENAYATPOUR <i>et al.</i> , 2018)
CNT-PDA-B	Ferritina	Estudo de dispersão e purificação de ferritina	(SOYEKWO <i>et al.</i> , 2018)
MWCNT-magnéticos	Catalase	Imobilização de CAT e reações enzimáticas	(RAFIEE-POUR <i>et al.</i> , 2019)
MWCNT-COOH e MWCNT-OH	Lipase	Imobilização de lipase e suporte.	(PADILHA <i>et al.</i> , 2018)
SWCNT e MWCNT	Dexorubicina	Liberação controlada para doxorubicina (quimioterapia)	(CHADAR <i>et al.</i> , 2021)
CNT	RNA influenza	Simulação de dinâmica molecular para adsorção de antivirais	(ANON; MOSADDEGHI; GHAYEB, 2019)
SWCNT	Ácidos nucleicos virais (SARS CoV-2)	Extração de ácido nucleico virais SARS-CoV-2	(JEONG <i>et al.</i> , 2021)

FONTE: Do autor.

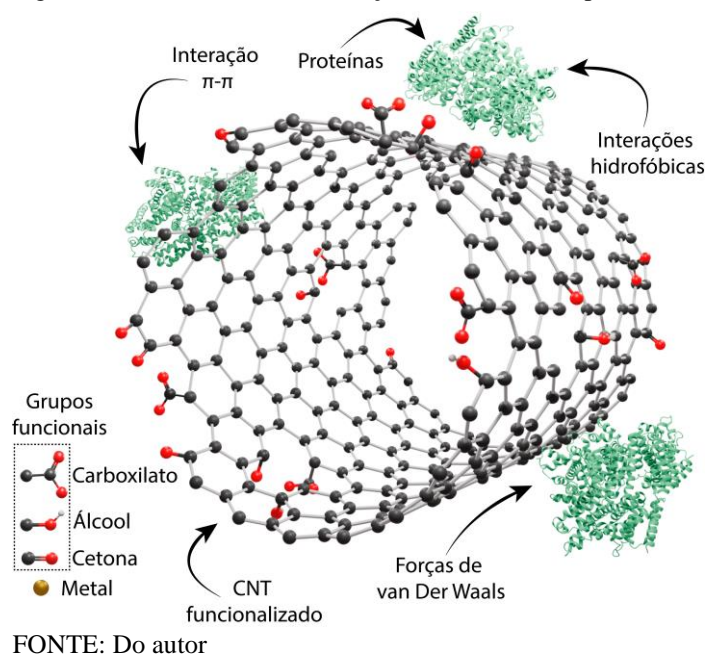
LEGENDA: MWCNT (Nanotubos de carbono de paredes múltiplas), SWCNT (Nanotubos de carbono de parede simples), BSA (Albumina de soro bovino), IgG (imunoglobulina), HSA (Albumina de soro humano), DNA (ácido desoxirribonucleico), RNA (ácido ribonucleico), SARS CoV-2 (Novo corona vírus), PEG (Polietilenoglicol), PDA (Polidopamina reticulada com borato).

### 2.3.3.5 Mecanismo de adsorção entre CNT e proteínas

Embora as propriedades dos CNT e proteínas sejam distintas, a junção CNT-proteína tem despertado um grande interesse da comunidade científica (CSIRE *et al.*, 2020; LU *et al.*, 2018; SALEEMI *et al.*, 2021).

As interações entre CNT e proteínas podem ser tratadas como funcionalizações não covalentes (SANGINARIO; MICCOLI; DEMARCHI, 2017). Nesse caso, as interações que ocorrem normalmente são fracas, destacando-se as forças de Van der Waals e interações hidrofóbicas, interações  $\pi$ - $\pi$  que ocorrem entre os elétrons deslocalizados da superfície dos CNT e os resíduos aromáticos das proteínas (histidinas, triptofano, fenilalaninas e tirosinas) e com menos frequência as interações eletrostáticas, relatadas em vários estudos com dependência da carga proteica e o pH do meio (MARCHESAN; PRATO, 2015; QUAN; LIU; ZHOU, 2019). Na Figura 11 estão representadas as principais interações entre os CNT e proteínas.

Figura 11 - Mecanismos de interações entre o CNT e proteínas.



## 2.4 MATERIAIS DE ACESSO RESTRITO (RAM)

A expressão “meio de acesso restrito” (RAM, do inglês, *restricted access media*), foi introduzida pela primeira vez na literatura por Desilets *et al.*, em 1991, como termo geral para suportes cromatográficos que permitem a injeção direta de fluidos biológicos e limitam a interação dentro dos poros apenas para moléculas pequenas (DESILETS; ROUNDS; REGNIER, 1991). A partir desse trabalho, vários materiais à base de sílica foram desenvolvidos e amplamente utilizados em extração direta de diferentes analitos nas mais diversas amostras biológicas (DE FARIA *et al.*, 2017; FUMES *et al.*, 2015; MENDES; ROSA; FIGUEIREDO, 2021; MULLETT, 2007; NAZARIO *et al.*, 2017; SOUVERAIN; RUDAZ; VEUTHEY, 2004).

Normalmente, a principal limitação na determinação de analitos presentes em matrizes biológicas (soro, plasma, urina, leite, etc.) é a incompatibilidade com macromoléculas presentes com a maioria das técnicas analíticas. Na cromatografia, essas provocam rápido entupimento da coluna e perda da eficiência na capacidade de sorção das colunas cromatográficas (LIMA; CASSIANO; CASS, 2006).

Para evitar a rápida deterioração das colunas, antes da análise cromatográfica, é necessário um pré-tratamento nas amostras biológicas. Na literatura, são reportados diversos procedimentos para a remoção das proteínas e interferentes em amostras biológicas. Porém, a baixa seletividade destes procedimentos pode resultar na perda de

alguns analitos através da coprecipitação, bem como na supressão iônica em espectrometria de massas, devido à presença de agentes precipitantes residuais (DE FARIA *et al.*, 2017; LIMA; CASSIANO; CASS, 2006).

As colunas RAM têm se mostrado uma boa alternativa para o estudo de matrizes biológicas, pois são capazes de excluir macromoléculas e reter apenas as moléculas de menor massa molecular. Nessas colunas, a superfície externa da sílica é coberta por uma rede hidrofílica, enquanto dentro dos poros atuam as interações hidrofóbicas, iônicas ou de afinidade (LIMA; CASSIANO; CASS, 2006). Devido ao tamanho desses poros, apenas pequenas moléculas são capazes de acessar o interior dos mesmos, já que uma barreira de difusão física impede que as macromoléculas consigam adentrar nesses poros. Quando a amostra é injetada em colunas deste tipo, ocorre também uma barreira de difusão química que é responsável não só pela retenção das pequenas moléculas, mas também pela não adsorção ou exclusão das macromoléculas (DE FARIA *et al.*, 2017; SOUVERAIN; RUDAZ; VEUTHEY, 2004).

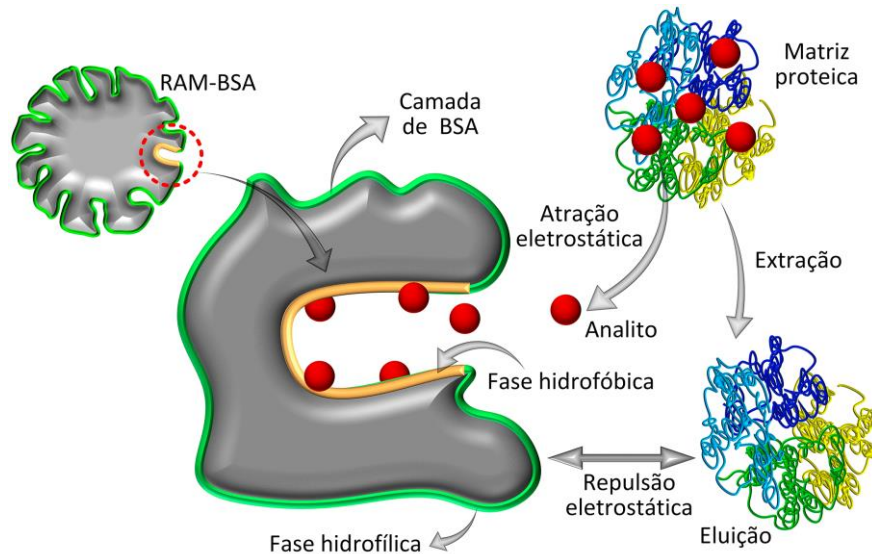
Na literatura são reportadas pesquisas tendo como objetivo, modificações dos sorventes convencionais para obter os RAM. Desta forma, todas as vantagens dos sorventes convencionais (como alta capacidade de adsorção e seletividade) podem estar associadas à capacidade de excluir proteínas (DE FARIA *et al.*, 2017).

Os materiais utilizados como adsorventes são: materiais à base de sílica, polímeros e mais recentes, os nanotubos de carbono, que podem ser convertidos em RAM através das modificações externas superficiais com grupos hidrofílicos (DE FARIA *et al.*, 2017).

De forma geral, os RAM possuem as barreiras química e física. A barreira química é caracterizada pela presença de grupos hidrofílicos impedindo a ligação irreversível de proteínas que são repelidas pela superfície dos RAM e a barreira física é caracterizada pelo pequeno tamanho dos poros, desempenhando um papel fundamental no mecanismo de exclusão de proteínas (DE FARIA *et al.*, 2017; SOUVERAIN; RUDAZ; VEUTHEY, 2004).

Em um trabalho realizado por Lima *et al.*, 2006, os autores relataram o procedimento de preparo de colunas RAM proteína-imobilizada do tipo albumina sérica bovina (RAM-BSA, do inglês *Restricted Access Media – Bovine Serum Albumin*). Neste estudo, as colunas foram preparadas e avaliadas quanto à capacidade de exclusão das proteínas do plasma e de retenção para uma série de fármacos ácidos, básicos e neutros (LIMA; CASSIANO; CASS, 2006). A Figura 12 representa um esquema para fases RAM simplificado do mecanismo de exclusão proteica e retenção de pequenas moléculas.

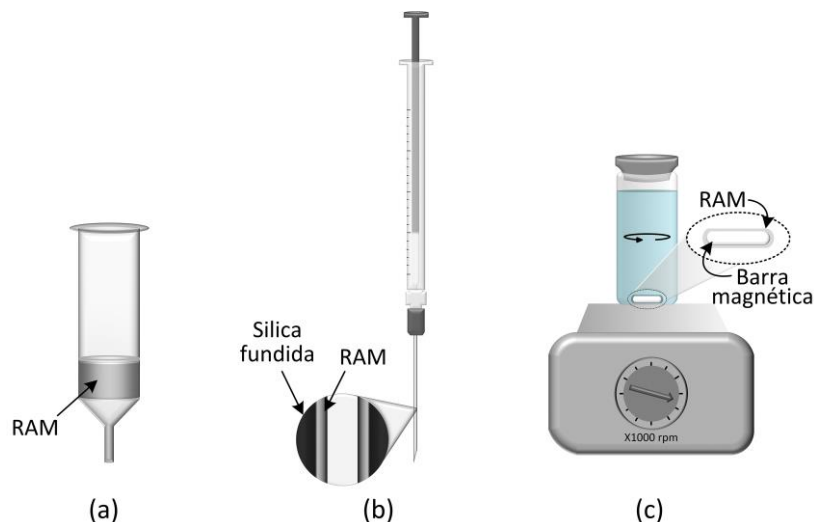
Figura 12 - Esquema representando a exclusão de proteínas e retenção das pequenas moléculas nas fases hidrofóbicas RAM-BSA.



FONTE: Adaptado de (LIMA; CASSIANO; CASS, 2006).

Os adsorventes sólidos RAM têm sido empregados nas técnicas miniaturizadas de extração por sorção. Destacam-se a SPE (CABALLERO-CASERO *et al.*, 2015; FENG *et al.*, 2016), SPME (SOUZA *et al.*, 2016) e SBSE (LAMBERT *et al.*, 2005). A figura 13 descreve as três técnicas utilizadas.

Figura 13 - Técnicas de: (a) extração em fase sólida, (b) microextração em fase sólida e (c) extração sortiva em barra de agitação.



FONTE: Adaptado de (DE FARIA *et al.*, 2017)

As possibilidades de aplicação de colunas RAM não se restringem apenas às análises de fluidos biológicos, mas também podem ser empregadas em amostras ambientais (BARREIRO *et al.*, 2010; PETROVIC; TAVAZZI; BARCELO, 2002),

análises de alimentos (CHICO *et al.*, 2008; DE PAULA; DE PIETRO; CASS, 2008), entre outras.

Devido às importantes aplicações dos materiais RAM utilizados na extração e pré-concentração de diversos analitos em matrizes complexas, são relatadas na literatura diversas revisões bibliográficas (DE FARIA *et al.*, 2017; FUMES *et al.*, 2015; MENDES; ROSA; FIGUEIREDO, 2021; MULLETT, 2007; NAZARIO *et al.*, 2017; SADÍLEK; ŠATÍNSKÝ; SOLICH, 2007; SOUVERAIN; RUDAZ; VEUTHEY, 2004). O quadro 11 apresenta resumidamente algumas aplicações na determinação de analitos orgânicos em matrizes complexas (sangue e plasma humano, urina, água, alimentos, etc).

Quadro 11 - Algumas aplicações recentes de RAM para determinação direta de analitos orgânicos em matrizes complexas.

(continua)

Amostra	Analito	Tipo de RAM	Técnica de preparação	Método	Referência
Soro humano	Anticonvulsivantes, derivados de metilxantinas e cefalosporinas	Fase interna: fenil, butil e octil e Fase externa: diol	SPE por injeção direta on line	HPLC-UV	(HAGINAKA; WAKAI, 1992; HAGINAKA; WAKAI; YASUDA, 1990)
	Barbitúricos	GFF II	SPE por injeção direta on line	HPLC-UV	(PERRY <i>et al.</i> , 1992)
	Benzodiazepinas	Licrosfer® RP-18 ADS	Coluna SMPE (comutação)	HPLC-UV	(MULLETT <i>et al.</i> , 2002)
Plasma humano	Antidepressivos	Licrosfer® RP-18 ADS	Coluna SMPE (comutação)	LC-MS/MS	(SANTOS-NETO <i>et al.</i> , 2008)
	Atropina, fenoterol, Ipratrópio, procaína, solatol e terbutalina	Licrosfer® 60 XDS (SO <sub>3</sub> /Diol), Licrosfer® RP-18 ADS	Coluna de comutação	HPLC-UV	(CHIAP <i>et al.</i> , 2002)
	Cetoprofeno, propranolol e imipramina	MC-ODS	Coluna de comutação	HPLC-UV	(YAMAMOTO <i>et al.</i> , 2009)
Urina	Ácidos mecaptúricos	Licrosfer® RP-18 ADS	Coluna de comutação	LC-MS/MS	(ECKERT <i>et al.</i> , 2012; ECKERT; GÖEN, 2014)
	Bacitracina, protamina, ribonuclease, lisozima e BSA	SCX-RAM	Coluna de comutação	2D HPLC-UV	(WILLEMSSEN; MACHTEJEVAS; UNGER, 2004)
	Peptídeos endógenos	SCX-RAM	Coluna de comutação	LC-MS/MS	(MACHTEJEVAS <i>et al.</i> , 2007)

Quadro 11 - Algumas aplicações recentes de RAM para determinação direta de analitos orgânicos em matrizes complexas.

(conclusão)

Amostra	Analito	Tipo de RAM	Técnica de preparação	Método	Referência
	Cefalosporinas	Microesferas magnéticas porosas de C-18 funcionalizadas	SPE (separação magnética)	LC-MS/MS	(LIU <i>et al.</i> , 2014)
Leite	Melamina e cioramazina	SCE-RAM Sil-g-p(SPM/EDMA)-g-p(GMMA)®	Coluna de comutação	HPLC-UV	(ZHANG <i>et al.</i> , 2014)
	Sulfonamidas	RAM-SCX-BSA	Coluna SMPE (comutação)	HPLC-UV	(XU <i>et al.</i> , 2010)
Ovo	Sulfamonometoxina e sulfadimetoxina	Hisep®	Coluna de comutação	HPLC-fluoresc.	(KISHIDA, 2007)
Mel	Claranfenicol	MAYI-ODS®	Coluna de comutação	LC-MS	(KAWANO <i>et al.</i> , 2015)

FONTE: Adaptado de (DE FARIA *et al.*, 2017).

LEGENDA: GFF (Glicina – L-fenilalanina- L-fenilalanina, XDS (Sílica diol troca iônica), ADS (Alquil diol sílica), ODS (Octadecilsilano), SCX (Troca catiônica forte), SPE (Extração em fase sólida), SMPE (Micro extração em fase sólida, HPLC-UV (Cromatografia líquida de alta performance com detector ultravioleta), LC-MS (Espectrometria de massas acoplada a cromatografia líquida), (LC-MS/MS) cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de massas do tipo triplo quadrupolo

#### 2.4.1 CNT de acesso restrito à ligação com macromoléculas por meio de recobrimento com albumina (RACNT-BSA)

Como descrito nos tópicos anteriores, os CNT são amplamente empregados, em diversos processos adsorptivos, na extração e pré-concentração de analitos orgânicos e inorgânicos em distintas matrizes complexas (GONZÁLEZ-SÁLAMO *et al.*, 2016; SOCAS-RODRÍGUEZ *et al.*, 2017). Essas aplicações são devidas às propriedades físicas e químicas intrínsecas desses materiais, destacando-se uma elevada resistência mecânica, elétrica, térmica e principalmente elevada área superficial, característica fundamental para estudos de adsorção (SOCAS-RODRÍGUEZ *et al.*, 2014).

Entretanto, em todas as aplicações em amostras biológicas, necessitam-se de uma etapa prévia no preparo das amostras a fim de eliminar o efeito indesejável das matrizes complexas, devido à presença de macromoléculas (proteínas). Quando os analitos encontram-se em meios com alta concentração de macromoléculas como nas amostras de sangue total, plasma, soro, alimentos e etc., o material não apresenta bom desempenho e retém grande quantidade de proteínas em sua superfície externa, causando perda de

seletividade, diminuição de sua vida útil e risco de degradação de colunas analíticas (BARBOSA *et al.*, 2015, 2016; DE FARIA *et al.*, 2017).

A maioria das técnicas analíticas utilizadas para a determinação de analitos orgânicos e inorgânicos, requer que a amostra esteja na forma de solução aquosa e livre de interferentes (macromoléculas e proteínas) para isso, são empregados métodos de decomposição (digestão por via úmida empregando ácido concentrado ou misturas, microondas, decomposição por combustão com elevadas temperaturas, etc.) (KRUG, 2016). Esses métodos de decomposição podem ser trabalhosos, perigosos e morosos. Além disso, são susceptíveis à contaminação da amostra e também perda dos analitos.

A fim de solucionar esse problema, Barbosa e colaboradores desenvolveram os nanotubos de carbono de acesso restrito revestidos com BSA entrecruzada quimicamente com glutaraldeído (RACNT-BSA) (BARBOSA *et al.*, 2015). Este material uniu as propriedades de exclusão proteica dos materiais RAM-BSA com a elevada capacidade de adsorção de moléculas orgânicas e inorgânicas dos CNT.

De acordo com os autores, os RACNT-BSA têm potencial para ampla utilização e comercialização em indústrias e laboratórios que trabalham com análises de metais e compostos orgânicos em fluidos biológicos, podendo ser acondicionados em qualquer sistema de extração, que utilize sorventes sólidos, com a grande vantagem de ser possível a injeção direta de fluidos proteicos sem qualquer etapa prévia de desproteíntização. Além disso, o RACNT-BSA foi utilizado mais de 300 vezes sem perder a capacidade de extração/exclusão (BARBOSA *et al.*, 2015, 2016). No quadro 12 estão representados trabalhos empregando esse material.

Quadro 12 - Algumas aplicações recentes de RAM para determinação direta de analitos orgânicos e inorgânicos em matrizes complexas.

(continua)

Tipo de CNT	Amostra	Analito	Técnica de preparação	Método	Referência
RACNT	Soro humano	Cd <sup>2+</sup>	Coluna com sistema FIA	TS-FF-ASS	(BARBOSA <i>et al.</i> , 2015)
RACNT	Soro humano	Pb <sup>2+</sup>	Coluna com sistema FIA	TS-FF-ASS	(BARBOSA <i>et al.</i> , 2016)
RACNT	Soro humano	Anti-hipertensivos	Coluna de comutação	HPLC-UV	(DE FARIA <i>et al.</i> , 2017)
RACNT	Plasma humano	Anti-convulsantes	Coluna de comutação	HPLC-UV	(DOS SANTOS <i>et al.</i> , 2017)

Quadro 12 - Algumas aplicações recentes de RAM para determinação direta de analitos orgânicos e inorgânicos em matrizes complexas.

(conclusão)

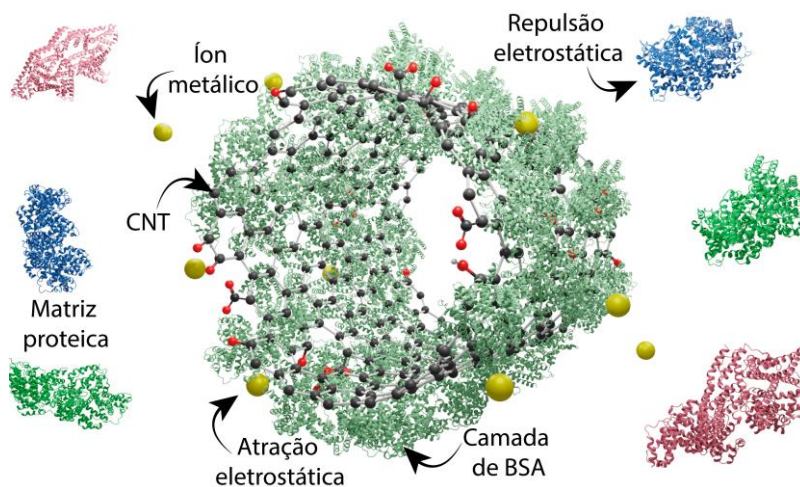
Tipo de CNT	Amostra	Analito	Técnica de preparação	Método	Referência
RACNT	Leite bovino	Tetraciclinas	Coluna de comutação	HPLC-UV	(DE FARIA <i>et al.</i> , 2017)
RACNT	Água de lago	Fungicidas	Extração em fase sólida por disco	GC-MS	(VIEIRA; SANTOS; FIGUEIREDO, 2017)
CNT e RACNT magnéticos	Solução de dismutase superóxido (Cu e Zn)	Cu <sup>2+</sup> e Zn <sup>2+</sup>	Extração em fase sólida	FAAS	(BALDUINO <i>et al.</i> , 2019)
CNT e RACNT magnéticos	Leite bovino	Pesticidas organofosforados	Separação por ímã	GC-MS	(CAMPOS DO LAGO <i>et al.</i> , 2020)
RACNT magnético	Leite bovino	Organofosforados	Separação por ímã e sistema FIA	HPLC-UV e UV-Vis	(FRUGERI <i>et al.</i> , 2020)
RACNT	Plasma humano	Anti-psicóticos	Microextração em fase sólida	HPLC-MS/MS	(CRUZ <i>et al.</i> , 2020)

FONTE: Do autor.

LEGENDA: FIA (Análise por injeção em fluxo), TS-FF-ASS (espectrometria de absorção atômica com forno tubular na chama e aerossol térmico), FAAS (Espectroscopia por absorção atômica por chama), HPLC-UV (Cromatografia líquida de alta performance com detector ultravioleta), GC-MS (Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas), HPLC-MS/MS (cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em Tandem HPLC-MS/MS).

Ao aplicar o RACNT-BSA em um meio contendo uma elevada concentração proteica e íons metálicos com o valor de pH da solução sendo superior ao ponto isoelétrico (pI) do adsorvente, as proteínas, presentes na solução, e a camada de BSA, do adsorvente, ficam carregadas negativamente. Portanto, ocorre uma repulsão eletrostática entre a camada de BSA e as proteínas e, simultaneamente, há uma atração eletrostática entre os íons metálicos (carregados positivamente) e a superfície do RACNT-BSA (GOMES *et al.*, 2016). Ressalta-se também a influência da barreira física, o qual é caracterizada pelo pequeno tamanho dos poros do adsorvente, pois apenas pequenas moléculas são capazes de acessar o interior dos mesmos e o impedimento das macromoléculas (DE FARIA *et al.*, 2017; DESILETS; ROUNDS; REGNIER, 1991). A Figura 14 mostra os possíveis mecanismos de exclusão proteica e extração de íons metálicos.

Figura 14- Nanotubos de carbono de acesso restrito revestidos com camada externa de BSA entrecruzada quimicamente com glutaraldeído (RACNT-BSA).



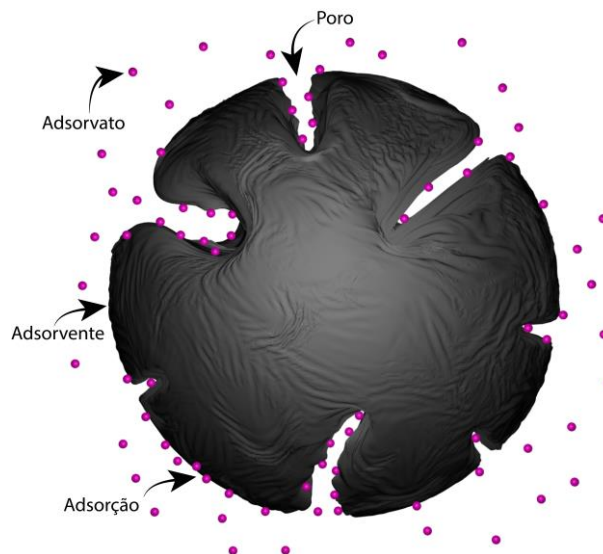
FONTE: Do autor

Ainda existem muitos fatos a serem elucidados sobre este material. Por exemplo, os mecanismos de interação envolvidos entre os íons metálicos e os diferentes materiais como CNT, CNTox e RACNT-BSA.

## 2.5 ADSORÇÃO

A adsorção é uma operação de transferência de massa, a qual estuda a habilidade de certos sólidos em concentrar na sua superfície determinadas substâncias existentes em fluidos líquidos ou gasosos, possibilitando a separação dos componentes desses fluidos. Uma vez que os componentes adsorvidos se concentram sobre a superfície externa, quanto maior essa superfície externa por unidade de massa sólida, tanto mais favorável será a adsorção. A espécie que se acumula na interface do material é normalmente denominada de adsorvato ou adsorbato e a superfície sólida na qual o adsorvato se acumula chama-se adsorvente ou adsorbente (RUTHVEN, 1984). A Figura 15 ilustra como ocorre o processo de adsorção em um sólido poroso.

Figura 15 - Processo de adsorção em um sólido adsorvente.



FONTE: Do autor.

A contaminação química da água é decorrente de inúmeros poluentes orgânicos e inorgânicos, gerados por fontes como esgotos industriais e domésticos. Os poluentes inorgânicos são metais tóxicos (mercúrio, cádmio, crômio, arsênio, chumbo, prata, cobre, níquel, ferro, entre outros) (BASSYOUNI *et al.*, 2020; SINGH *et al.*, 2021) e orgânicos como BTEX (benzeno, Tolueno, etilbenzeno e xilenos) que são compostos voláteis encontrados na gasolina e derivados de petróleo (ANJUM *et al.*, 2019) e HPAs (Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos), que são compostos produzidos a partir da queima incompleta de substância como carvão, lenha e gasolina (MATEOS *et al.*, 2019). Essas substâncias, encontradas em quantidades traço, geralmente, oferecem resistência a métodos de degradação biológica ou não são removidos efetivamente por métodos de tratamento físico-químicos (SINGH *et al.*, 2021).

A adsorção tornou-se, então, um dos métodos mais populares para esse fim, ganhando importância como um processo de separação e purificação, nas últimas décadas. Esse método tem sido objeto de interesse dos cientistas, apresentando importância tecnológica, biológica, além de aplicações práticas na indústria e na proteção ambiental, tornando-se uma ferramenta útil em vários setores (BASSYOUNI *et al.*, 2020; BORJI *et al.*, 2020; YIN *et al.*, 2020). Além disso, a adsorção é um dos processos mais eficientes de tratamento de águas e águas residuárias, sendo empregado nas indústrias a fim de reduzir os níveis de compostos tóxicos ao meio ambiente dos seus efluentes (DE OLIVEIRA *et al.*, 2020; SABZEHMEIDANI *et al.*, 2021; YANG *et al.*, 2019).

### 2.5.1 Tipos de adsorção

A interação entre o soluto e a superfície do adsorvente resulta da existência de forças atrativas não compensadas na superfície do sólido. Conforme a natureza das forças envolvidas, podemos distinguir dois tipos de adsorção, adsorção física (fisissorção) e adsorção química (quimissorção) (TAN; HAMEED, 2017; TRAN *et al.*, 2017).

Os conceitos de quimissorção e a fisissorção são distintos. Entretanto, os dois mecanismos de adsorção não são completamente independentes. A distinção se uma espécie é física ou quimicamente adsorvida não é clara (ADAMSON; GAST, 1997) e, muitas vezes, ambos os processos podem ser descritos em termos dos princípios de adsorção física. De forma geral, as diferenças entre a adsorção física e adsorção química são relatadas nos dois próximos tópicos.

#### 2.5.1.1 Adsorção física ou fisissorção

A adsorção física, a ligação do adsorbato à superfície do adsorvente envolve uma interação relativamente fraca que pode ser atribuída às forças de Van der Waals, que são similares às forças de coesão molecular e interações eletrostática. Do ponto de vista termodinâmico, a energia de ligação adsorbato-adsorvente apresenta um valor entálpico médio abaixo de 10 Kcal mol<sup>-1</sup>. Ou seja, da ordem de uma condensação/vaporização. Ressalta-se que a adsorção física, é inespecífica. Outra maneira de se interpretar a adsorção física sugere que ela ocorre quando forças intermoleculares de atração das moléculas na fase fluida e da superfície sólida são maiores que as forças atrativas entre as moléculas do próprio fluido (TAN; HAMEED, 2017; TRAN *et al.*, 2017). Este tipo de adsorção é rápido e reversível decorrendo da ação de forças de atração intermoleculares fracas entre o adsorvente e as moléculas adsorvidas (TAN; HAMEED, 2017; TRAN *et al.*, 2017). Outra peculiaridade da fisissorção é a possibilidade de haver várias camadas de moléculas adsorvidas (TAN; HAMEED, 2017).

#### 2.5.1.2 Adsorção química ou quimissorção

A quimissorção envolve a troca ou partilha de elétrons (ligações covalentes) entre as moléculas do adsorbato e a superfície do adsorvente, resultando em uma reação química. Isso resulta essencialmente numa nova ligação química e, portanto, bem mais

forte que no caso da fisissorção. Ou seja, da ordem do calor de reação, acima de 20 kcal mol<sup>-1</sup> (TAN; HAMEED, 2017). A adsorção química é altamente específica e nem todas as superfícies sólidas possuem sítios ativos capazes de adsorver quimicamente o adsorbato. Deve-se ressaltar que nem todas as moléculas, presentes no fluido, podem ser adsorvidas quimicamente, somente aquelas capazes de se ligar ao sítio ativo e, também, como não ocorre formação ou quebra de ligações, a natureza química do adsorbato não é alterada (TAN; HAMEED, 2017; TRAN *et al.*, 2017).

### **2.5.2 Fatores que afetam no processo de adsorção**

Os fenômenos de adsorção são resultados de uma combinação entre os tipos de forças envolvidas na adsorção física e química. Desta forma, a eficiência da adsorção de um dado soluto depende de vários fatores os quais incluem: natureza do adsorvente adsorbato e as condições de adsorção (SALAME; BANDOSZ, 2003).

As características dos adsorventes dependem da área superficial, distribuição do tamanho dos poros, conteúdo de cinzas, densidade e o tipo de grupos funcionais presentes na superfície. A natureza do adsorbato depende da polaridade, hidrofobicidade, tamanho da molécula, solubilidade e acidez ou basicidade (determinado pela natureza do grupo funcional presente na superfície) (SALAME; BANDOSZ, 2003; TAN; HAMEED, 2017).

Para as condições de adsorção, os fatores que influenciam são: temperatura, polaridade do solvente, velocidade de agitação (dispersão de partículas homogêneas), relação das quantidades de sólido/líquido (quanto mais alta, maior a taxa de adsorção), tamanho das partículas (quanto menor o tamanho, maior a superfície de contato), concentração inicial (taxa é proporcional à concentração inicial usada porque modifica o coeficiente de difusão) e presença de outras espécies competindo pelos sítios de adsorção.

A matéria mineral (cinzas) do adsorvente tem, por regra geral, um efeito deletério sobre o processo de adsorção, já que pode preferencialmente adsorver água devido ao seu caráter hidrófilo, reduzindo a adsorção do adsorbato (BANSAL; GOYAL, 2005). Também, impurezas da superfície do carvão podem limitar a adsorção, podendo repelir as moléculas do adsorbato (ADAMSON; GAST, 1997).

Muitos trabalhos reportam o valor de pH e os grupos funcionais como sendo os parâmetros mais importantes para influenciar e controlar a adsorção de íons metálicos e de compostos orgânicos e inorgânicos em soluções aquosas. Estes dois parâmetros

determinam a natureza e a concentração iônica de espécies moleculares em solução (BANSAL; GOYAL, 2005). O pH afeta a adsorção na medida em que determina o grau de distribuição das espécies químicas. A intensidade desse efeito pode ser maior ou menor conforme o adsorvente, uma vez que as cargas da superfície do adsorvente dependem da sua composição e das características da superfície (DE OLIVEIRA *et al.*, 2020; TAN; HAMEED, 2017).

Um índice conveniente da tendência de uma superfície se tornar positiva ou negativamente carregada, em função do pH, é o valor requerido deste para que a carga líquida do adsorvente seja nula, o chamado ponto de carga zero, pH(pzc). Para valores de pH inferiores ao pH(pzc), a carga superficial é positiva e a adsorção de ânions é favorecida; e, para valores de pH superiores ao pH(pzc), a carga superficial é negativa e a adsorção de cátions é favorecida (TAN; HAMEED, 2017; TRAN *et al.*, 2017).

### 2.5.3 Cinética de adsorção

Os estudos cinéticos de adsorção são importantes para compreensão da interação adsorvente/adsorvato, através da determinação de parâmetros como ordem de reação, constante de velocidade, energia de ativação, taxa de adsorção inicial. O estudo cinético também estabelece os tempos necessários para se alcançar o equilíbrio para determinadas condições experimentais. Estes tempos são necessários para os estudos de adsorção em equilíbrio e para o perfeito planejamento do emprego do material como adsorvente sólido, para que o processo ocorra no tempo mais rápido e eficiente possível, com economia de tempo e de custos.

Portanto, a dinâmica, de um processo de adsorção, pode ser estudada através de sua cinética, a qual descreve a taxa de soluto que é removido do sistema pelo adsorvente por um certo tempo. Predizer a taxa de remoção do adsorvato pelo adsorvente, é um fator crucial para o projeto de qualquer sistema que empregue a técnica de adsorção (PLAZINSKI; RUDZINSKI; PLAZINSKA, 2009).

Nesse sentido, alguns modelos foram propostos para descrever o comportamento cinético dos processos de adsorção, podendo ser divididos em três categorias principais: Modelos reacionais, difusionais e exponenciais duplos (RUSSO *et al.*, 2015). Os modelos reacionais são baseados em taxas de reações químicas (ARM, do inglês *Adsorption Reaction Model*), que consideram que a adsorção pode ser expressa como uma reação química, já os modelos difusionais são baseados nos processos de transferência de massa

(ADM, do inglês *Adsorption Difusional Model*), onde os caminhos difusionais do adsorvato são levados em consideração e os modelos exponenciais duplos (DEM, do inglês *Double Exponencial Model*), consideram termos de difusão interna e externa.

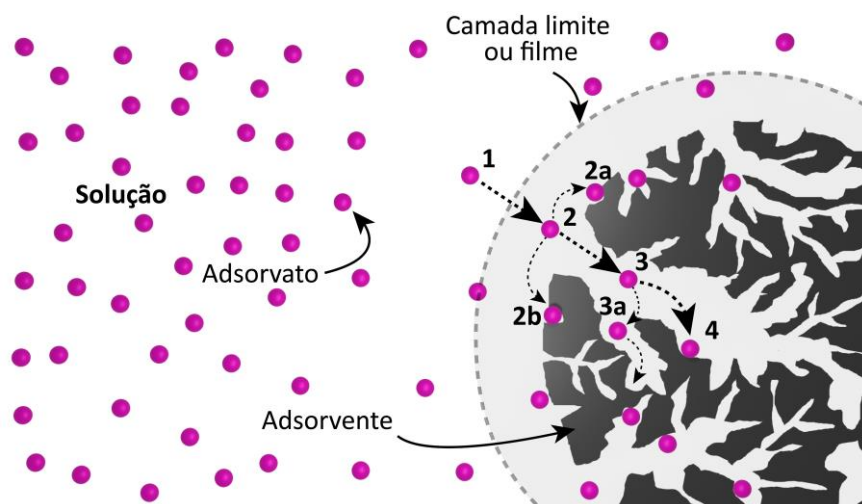
Os principais modelos utilizados são os modelos reacionais, baseados na lei da velocidade para reações químicas. Eles consideram o processo de adsorção como um todo, sem levar em conta todas as suas etapas (QIU *et al.*, 2009). Esses também são os modelos mais simples, uma vez que seus parâmetros podem ser facilmente obtidos por meio de regressões lineares ou não lineares (RUSSO *et al.*, 2015).

A descrição da cinética dos processos de adsorção é muito mais complicada do que a descrição teórica do seu equilíbrio, pois leva em consideração a evolução do processo em condições de não-equilíbrio (PLAZINSKI; RUDZINSKI; PLAZINSKA, 2009). De um modo geral, o processo de adsorção é descrito em quatro etapas principais:

- 1<sup>a</sup>) Transporte do adsorvato do seio da solução até a interface com o filme estagnado que circunda as partículas de adsorvente, ou seja, *difusão do adsorvato em solução para a superfície externa do adsorvente*;
- 2<sup>a</sup>) Difusão do adsorvato através desse filme estagnado (difusão externa), ou seja, *adsorção nos sítios da superfície externa do adsorvente*;
- 3<sup>a</sup>) Difusão do adsorvato no líquido intersticial do adsorvente e superficialmente ao longo dos poros (difusão intrapartícula), ou seja, *difusão do adsorvato da superfície para o interior do adsorvente até os sítios de adsorção (poros)*;
- 4<sup>a</sup>) Adsorção/dessorção do adsorvato na superfície interna do adsorvente, ou seja, *adsorção dos adsorvatos nos sítios disponíveis na superfície interna*.

As referidas etapas podem ser melhor visualizadas no esquema apresentado na Figura 16.

Figura 16 - Processos envolvidos na adsorção em adsorventes porosos.



FONTE: Adaptado de (TAN; HAMEED, 2017)

Geralmente, a transferência de massa relativas às etapas 1 (transferência para o filme) e 4 (retenção no sítio ativo) não são considerados limitantes, uma vez que a agitação do sistema é suficiente para evitar a ocorrência de um gradiente de concentração no seio da solução e a adsorção nos sítios é considerado um processo praticamente instantâneo. Portanto, as etapas que controlam efetivamente a cinética de adsorção são geralmente os mecanismos de difusão externa, de difusão intrapartícula ou ambos (QIU *et al.*, 2009; TAN; HAMEED, 2017; TRAN *et al.*, 2017).

## 2.5.4 Modelos cinéticos de adsorção

A fim de compreender melhor a cinética do processo de adsorção dos íons metálicos pelo CNT, serão descritos a seguir os principais modelos reacionais (pseudo-primeira ordem, pseudo-segunda ordem, Elovich (quimissorção) e Avrami (fracionário) e o modelo difusional (Webber e Morris-difusão intrapartícula) utilizados nesse trabalho.

### 2.5.4.1 Pseudo-primeira ordem

No final do século XIX, Lagergren desenvolveu uma equação empírica que descrevia o processo cinético de adsorção em um sistema sólido-líquido. Utilizando os ácidos oxálico e malônico, juntamente com carvão vegetal, essa equação, denominada equação de Lagergren, ou equação de pseudo-primeira ordem, foi um dos primeiros

modelos apresentados na literatura para descrever a cinética de processos de adsorção (PLAZINSKI; RUDZINSKI; PLAZINSKA, 2009).

Esse modelo apresenta bom ajuste aos processos em que são utilizadas soluções muito diluídas, em que a variação da quantidade de soluto adsorvido, com o tempo, é diretamente proporcional a diferença entre a quantidade do soluto adsorvida no equilíbrio e quantidade adsorvida em um tempo qualquer. O modelo cinético de pseudo-primeira ordem, em sua forma diferencial, pode ser representado conforme a Equação (1):

$$\frac{dq_t}{dt} = k_1(q_e - q_t) \quad (1)$$

onde  $q_e$  e  $q_t$  são as quantidades de adsorvato retidas por grama do adsorvente no equilíbrio e no tempo qualquer, respectivamente ( $\text{mg. g}^{-1}$ ); e  $k_1$  é a constante cinética de pseudo-primeira ordem ( $\text{min}^{-1}$ ) (PLAZINSKI; RUDZINSKI; PLAZINSKA, 2009).

Se forem utilizadas as condições de contorno  $q_t = 0, t = 0$ ; quando  $q_t = q_e, t = t$  durante a integralização da equação 1, tem-se a equação 2 em sua forma linear, onde o valor de  $k_1$  pode ser determinado pelo gráfico de  $\ln(q_e - q_t)$ :

$$\ln(q_e - q_t) = \ln q_e - k_1 t \quad (2)$$

Após rearranjar a equação 2, isolando o  $q_t$ , tem-se a equação 3 em sua forma não linear utilizada para o ajuste;

$$q_t = q_e(1 - \exp^{-k_1 t}) \quad (3)$$

Esse modelo é amplamente utilizado em correlações de dados experimentais para se obter os parâmetros de adsorção, porém ele não fornece uma representação eficaz dos dados experimentais durante toda faixa de tempo de contato, sendo normalmente aplicado nos estágios iniciais do processo de adsorção estudado (TAN; HAMEED, 2017; TRAN *et al.*, 2017)

#### 2.5.4.2 Pseudo-segunda ordem

A equação cinética de pseudo-segunda ordem é um modelo empírico, em que se assume que a velocidade da reação é dependente da quantidade do soluto adsorvido na superfície do adsorvente e da quantidade adsorvida no equilíbrio (HO; MCKAY, 1999). Esse modelo pode ser expresso pela equação 4:

$$\frac{dq_t}{dt} = k_2(q_e - q_t)^2 \quad (4)$$

em que  $k_2$  é a constante da velocidade de segunda ordem ( $\text{g mg}^{-1}\text{min}^{-1}$ ). Integrando a equação 4 e aplicando as condições de contorno:  $q_t = 0$  a  $q_t = q_t$ ,  $t = 0$  a  $t = t$ , obtém-se a equação 5.

$$\frac{t}{(q_e - q_t)} = \frac{1}{q_e^2} + k_2 t \quad (5)$$

Linearizando a equação 5, tem-se a equação 6:

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2 q_e^2} + \frac{t}{q_e} \quad (6)$$

Os valores de  $q_e$  e  $k_2$  podem ser obtidos pelo intercepto e a inclinação da curva apresentada no gráfico  $(t/q_t)$  versus  $t$ . Se o modelo cinético de pseudo-segunda ordem for aplicável, a plotagem de  $(t/q_t)$  versus  $t$  deve apresentar uma relação linear próxima a 1. Isolando o  $q_t$ , tem-se a equação não linear utilizada para o ajuste:

$$q_t = \frac{k_2 q_e^2 t}{1 + k_2 q_e t} \quad (7)$$

Enquanto o modelo de pseudo-primeira ordem descreve apenas os estágios iniciais da adsorção, o de pseudo-segunda ordem se propõe a relatar o comportamento do processo durante todo o tempo do processo. Ele também considera como a etapa principal do processo a reação do adsorbato no sítio ativo do adsorvente, envolvendo troca ou compartilhamento de elétrons, descrevendo, principalmente, um processo com

comportamento de natureza química (quimissorção) como etapa dominante (TAN; HAMEED, 2017; TRAN *et al.*, 2017).

#### 2.5.4.3 Elovich (quimissorção)

A equação de Elovich, que considera uma diminuição exponencial da taxa de adsorção com o aumento da quantidade adsorvida, é geralmente utilizada para determinar a cinética de quimissorção de gases em suportes sólidos com superfícies heterogêneas e tem sido empregada com sucesso em processos de cinética de adsorção lenta, pois se ajusta a  $q_t$  infinitos em longos períodos de tempo (INYANG; ONWAWOMA; BAE, 2016; TAN; HAMEED, 2017). Ela pode ser representada pela seguinte expressão:

$$\frac{dq_t}{dt} = \alpha \cdot e^{-\beta q_t} \quad (8)$$

Integrando a equação 8 e aplicando as condições de contorno:  $q_t = 0$  a  $q_t = q_t$ ,  $t = 0$  a  $t = t$ , obtém-se a equação 9.

$$q_t = \frac{\ln(t + t_0)}{\beta} - \frac{\ln(t_0)}{\beta} \quad (9)$$

na qual  $t_0 = 1/\alpha\beta$ , onde  $\alpha$  é a taxa inicial de adsorção ( $\text{mg g}^{-1} \text{min}^{-1}$ ) e  $\beta$  é a constante relacionada à extensão da camada superficial e à energia de ativação envolvida no processo de quimissorção ( $\text{g. mg}^{-1}$ ).

Se  $t$  for muito maior que  $t_0$ , a equação cinética pode ser simplificada como:

$$q_t = \frac{\ln(\alpha\beta)}{\beta} + \frac{\ln(t)}{\beta} \quad (10)$$

#### 2.5.4.4 Avrami (fracionário)

Apesar dos modelos cinéticos, de pseudo-primeira ordem e pseudo-segunda ordem, serem modelos cinéticos de adsorção mais comumente empregados, a determinação de alguns parâmetros cinéticos, tais como as possíveis mudanças das taxas

de adsorção, em função da concentração inicial do adsorvato e do tempo de contato adsorvente-adsorvato, como também a determinação de modelos cinéticos de ordem fracionária, ainda precisam ser mais bem avaliados.

Dessa forma, uma equação cinética alternativa, de ordem fracionária, foi proposta por Lopes e colaboradores, na qual se fez uma adaptação à função exponencial de Avrami, utilizada para estudar cinética de decomposição térmica (LOPES *et al.*, 2003).

$$\alpha = 1 - \exp[-(k_{av}t)]^{n_{av}} \quad (11)$$

na qual  $\alpha$  é a fração de adsorção ( $qt/q_e$ ) no tempo  $t$ , e  $k_{av}$  é a constante cinética de Avrami ( $\text{min}^{-1}$ ), e  $n_{av}$  a ordem fracionária do processo de adsorção que está associada às mudanças de ordem de adsorção de acordo com o tempo de contato adsorvente-adsorvato (LOPES *et al.*, 2003).

Inserindo-se  $\alpha$  na equação 8, obtém a equação 12, denominada equação cinética de adsorção de Avrami e pode ser descrita como:

$$q_t = q_e \{1 - \exp[(k_{av}t)]^{n_{av}}\} \quad (12)$$

De forma geral, os modelos reacionais de pseudo-primeira ordem, pseudo-segunda ordem, Elovich, Avrami, entre outros, podem ser utilizados para encontrar e comparar taxas de adsorção e capacidades adsorptivas, nas condições experimentais específicas, esses não são capazes de descrever adequadamente os mecanismos de adsorção e cada etapa do processo de adsorção (TAN; HAMEED, 2017; TRAN *et al.*, 2017). No entanto, o mecanismo de adsorção não deve ser descrito apenas a partir da aplicação e dos bons resultados no ajuste desses modelos.

Desta forma, observou-se uma tendência na literatura da substituição destes modelos cinéticos convencionais por modelos mais robustos, como os difusionais, que demonstram ser capazes de prever a adsorção em sólidos porosos de forma mais realista. Isto porque estes modelos consideram em seu desenvolvimento as diferentes etapas de um processo adsorptivo (DÍAZ-BLANCAS *et al.*, 2018; FRÖHLICH *et al.*, 2018; SOUZA; DOTTO; SALAU, 2019).

#### 2.5.4.5 Mecanismo de adsorção: Modelo de Difusão Intrapartícula

Para identificar os mecanismos de transferência de massa no processo de adsorção de íons ferro nos três diferentes adsorventes preparados, o modelo de difusão intrapartícula proposto por Weber e Morris (1963) foi ajustado aos dados experimentais. Este modelo relaciona a capacidade de adsorção ( $q_t$ ) com a raiz quadrada do tempo ( $t^{1/2}$ ), conforme pode ser observado pela equação 13 (TAN; HAMEED, 2017; TRAN *et al.*, 2017; WEBER; MORRIS, 1963).

$$q_t = k_{id}t^{1/2} + C \quad (13)$$

em que:  $k_{id}$  é a constante de velocidade de difusão intrapartícula ( $\text{mg g}^{-1} \text{min}^{-1/2}$ ) e  $C$  é a constante relacionada com a resistência à difusão ( $\text{mg g}^{-1}$ ) ou seja, o valor de  $C$  está relacionado à espessura da camada-limite (camada viscosa ao redor da partícula – forças viscosas) e quanto maior for o valor dessa constante, maior será o efeito da camada-limite (TAN; HAMEED, 2017; WEBER; MORRIS, 1963). Construindo um gráfico de  $q_t$  versus  $t^{1/2}$ , deve-se obter uma reta, onde  $K_{id}$  é a inclinação da reta e o valor de  $C$  é o ponto de intersecção.

Caso a dependência entre  $q_t$  versus  $t^{1/2}$  seja linear e passar pela origem, o único mecanismo que controla a cinética de adsorção é a difusão intrapartícula e, se o coeficiente linear for diferente de zero, então o processo dominante pode ser uma difusão externa (TAN; HAMEED, 2017). O gráfico de  $q_t$  versus  $t^{1/2}$  pode apresentar multilinearidade, indicando que dois ou mais fenômenos de transferência estão envolvidos no processo de adsorção e cada fenômeno representa uma etapa. A primeira porção da curva, de maior inclinação, corresponde à difusão externa (*fase de adsorção na superfície externa do adsorvente*); a segunda está relacionada à difusão intrapartícula (*adsorção dos íons na parte interna do adsorvente – poros do material*), e a terceira indica o equilíbrio do processo de adsorção. Nesta fase, determina-se a capacidade máxima de adsorção (TAN; HAMEED, 2017; TRAN *et al.*, 2017; WEBER; MORRIS, 1963).

### 3 OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho são apresentados a seguir.

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Sintetizar e caracterizar os CNT, CNTox e RACNT-BSA; avaliar a adsorção de Fe (III), em solução aquosa por esses materiais e obter apoproteínas a partir da extração de íons Fe da catalase (CAT) empregando o RACNT-BSA.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos foram:

- a) Avaliar a funcionalização ácida dos CNT e o recobrimento dos CNTox com BSA;
- b) Caracterizar os materiais obtidos CNT, CNTox e RACNT-BSA por diferentes técnicas: MET, MEV-EDS, TGA, FTIR e PZ;
- c) Aplicar os materiais CNT, CNTox e RACNT-BSA na adsorção de íons Fe (III), em solução aquosa, e avaliar os modelos cinéticos de adsorção de pseudo-primeira ordem, pseudo-segunda ordem, Avrami (fracionário), Elovich (quimissorção) e Difusão intrapartícula (Webber-Morris) para compreensão dos mecanismos e interações ocorridas;
- d) Avaliar a influência do pH nas interações dos RACNT-BSA com macromoléculas (soluções protéicas de CAT) por estudos de capacidade de exclusão proteica e na extração de Fe (III) a partir da CAT;
- e) Avaliar a atividade enzimática da CAT antes e após a remoção de Fe e o potencial de obtenção de apoproteínas.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste tópico será descrito o material de partida, reagentes e soluções e a metodologia experimental.

### 4.1 MATERIAL DE PARTIDA

Os CNT utilizados foram os de paredes múltiplas, adquiridos da Sigma-Aldrich®, Sant Louis, EUA, foram produzidos pelo método de Deposição Termoquímica de Vapor e pureza mínima de 95% (massa), com diâmetro da parede exterior na faixa de 6 a 9 nm e comprimento de 5  $\mu\text{m}$ .

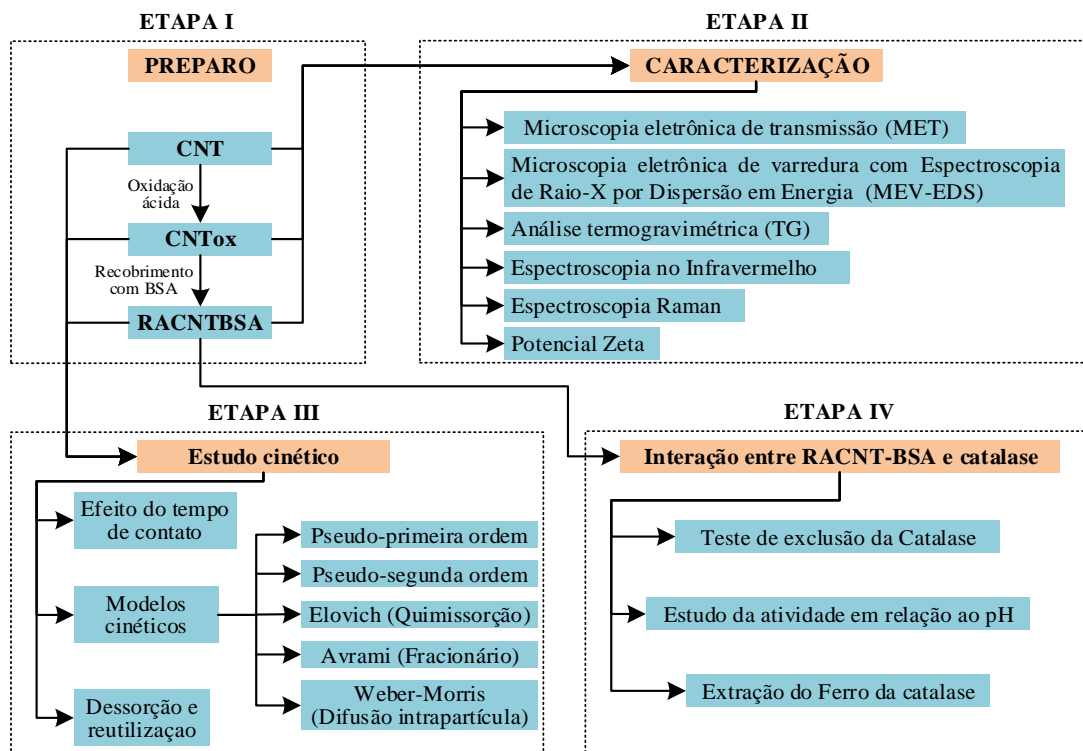
### 4.2 REAGENTES E SOLUÇÕES

Os reagentes, ácido nítrico 65% (v/v), ácido acético glacial P.A, ácido fosfórico P.A, TRIS-HCl e hidróxido de sódio 0,1 mol L<sup>-1</sup> (previamente padronizado com padrão primário de biftalato de potássio), foram utilizados para o preparo dos tampões; albumina de soro bovino (BSA), catalase de fígado bovino (CAT), glutaraldeído e borohidreto de sódio (todos da Sigma-Aldrich) foram usados para a funcionalização e revestimento dos CNT. Os padrões de Fe utilizados no trabalho foram previamente preparados a partir da diluição de uma solução estoque de 1.000 ppm de Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>.9H<sub>2</sub>O (sal adquirido da Sigma-Aldrich®, Saint Louis, EUA).

### 4.3 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

Para melhor entendimento, este trabalho foi dividido em quatro etapas (Figura 17): Na primeira etapa, foi descrito o preparo dos materiais CNT, CNTox e RACNT-BSA, na segunda etapa, as técnicas de caracterização dos materiais, terceira o estudo cinético e na quarta, foi abordada o estudo de interação entre o RACNT-BSA e a proteína de catalase.

Figura 17 - Fluxograma geral da metodologia.



FONTE: Do autor

#### 4.3.1. Descrição dos materiais

A fim de facilitar a identificação dos materiais, no quadro 13 estão representados a descrição de cada material preparado e as siglas correspondentes: CNT (material precursor para a síntese dos outros materiais), CNTox (CNT oxidado com ácido nítrico  $2,6 \text{ mol L}^{-1}$ ), RACNT-BSA (CNTox revestido com BSA entrecruzada com glutaraldeído), BSA (BSA sua forma pura), BSA int. (BSA entrecruzada com glutaraldeído) e CAT (catalase).

Quadro 13 - Descrição dos materiais e siglas correspondentes.

Descrição dos materiais	Siglas
CNT precursor	CNT
CNT oxidado com $\text{HNO}_3$ $2,6 \text{ mol L}^{-1}$	CNTox
CNTox. revestido com BSA entrecruzada com glutaraldeído	RACNT-BSA
BSA pura	BSA
BSA entrecruzada com glutaraldeído	BSA int.
Catalase	CAT

FONTE: Do autor.

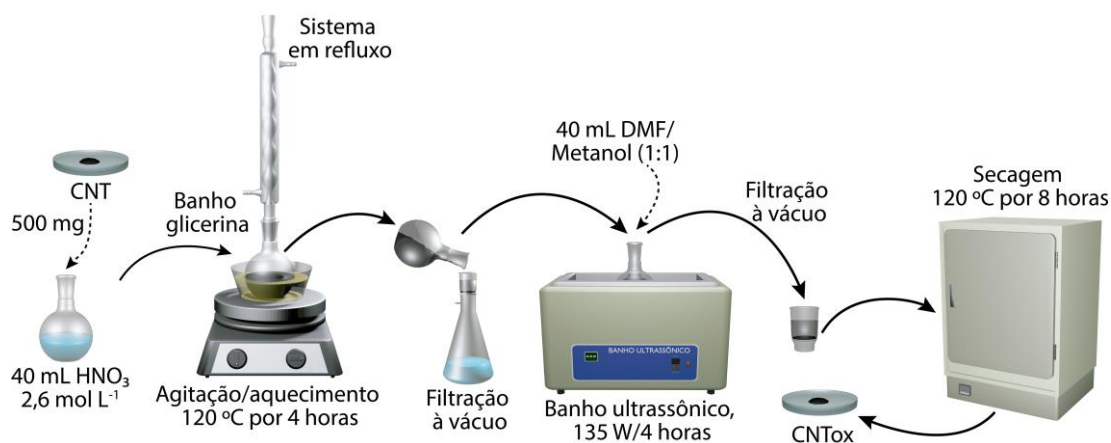
### 4.3.2 Preparo e síntese dos materiais CNT, CNTox e RACNT-BSA (ETAPA I)

Neste tópico foi descrito detalhadamente a síntese dos materiais, que foi dividido em duas partes: funcionalização ou oxidação dos CNT e o recobrimento dos CNTox com BSA.

#### 4.3.2.1 Funcionalização dos CNT

O procedimento de funcionalização foi adaptado de (TCHOUL *et al.*, 2007). Para a funcionalização com  $\text{HNO}_3$ , transferiu-se 500 mg dos CNT precursor (CNT) para um balão de fundo redondo preenchido com 40 mL do ácido nítrico  $2,6 \text{ mol L}^{-1}$ . Em seguida, montou-se o sistema em refluxo, sob agitação magnética à temperatura de  $120^\circ \text{C}$  por 4 h. Filtraram-se os nanotubos em um sistema à vácuo com cadinho de Gooch de vidro com placa porosa. Depois da filtragem, o material (CNTox) foi lavado com água destilada e, em seguida, lavado com 10 mL de metanol e 10 mL de N,N-dimetilformamida (DMF). Por fim, os CNTox foram vertidos em um balão de fundo redondo contendo 40 mL de DMF/Metanol (1:1) e mantida a suspensão em banho ultrassônico (Cole Parmer -135 W, 4 KHz) por 1 h. Finalmente, secou-se o material a  $120^\circ \text{C}$  por 12 h, em estufa, triturou-se no grau e pistilo e transferidos para uma placa de Petri. Na Figura 18 está esquematizado o processo de funcionalização descrito.

Figura 18 - Sequência das etapas de funcionalização do CNT

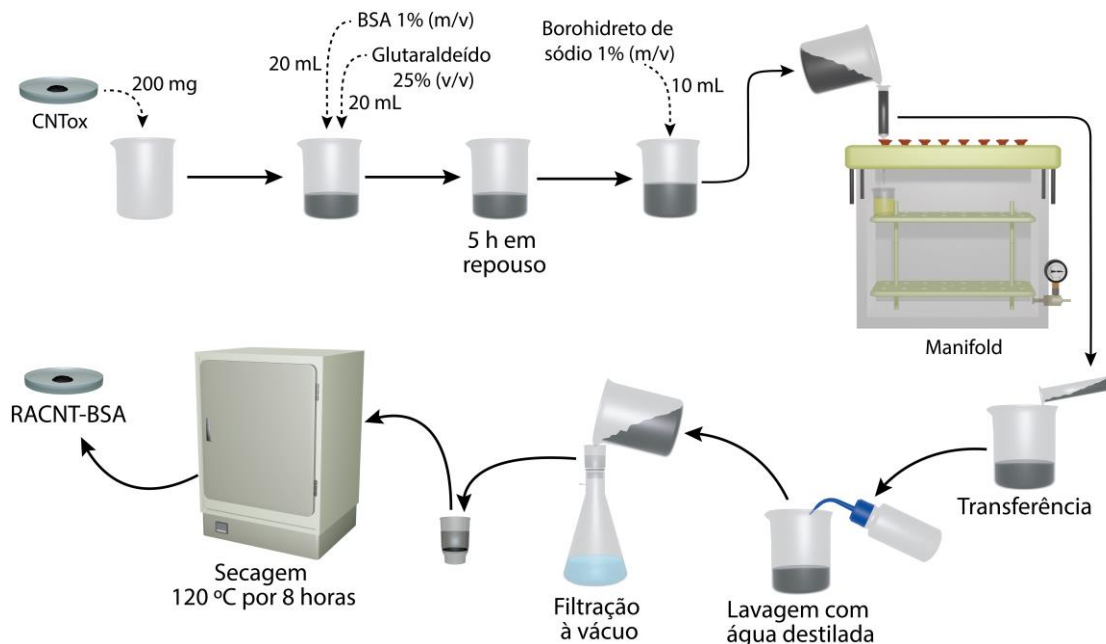


FONTE: Do autor.

#### 4.3.2.2 Recobrimento dos CNTox com BSA (RACNT-BSA)

Os CNTox foram recobertos com BSA, segundo a metodologia descrita por (BARBOSA *et al.*, 2015) com adaptações. De acordo com o esquema representativo (Figura 19), utilizou-se um sistema *manifold* e bomba à vácuo para a realização do recobrimento. Primeiramente, foram pesados 200 mg de CNTox e transferido para um béquer de 50 mL, em seguida adicionou-se sequencialmente, 20 mL de solução de BSA 1% (m/v) em tampão fosfato 50 mmol L<sup>-1</sup> (pH = 5,7) e 5 mL de uma solução aquosa de glutaraldeído 25% (v/v). Transcorrido um período de 5 h, adicionou-se 10 mL de uma solução aquosa de borohidreto de sódio de 1% (m/v), com a finalidade de reduzir as iminas (bases de Schiff) a aminas, que são grupamentos mais estáveis quimicamente, conferindo assim estabilidade química ao material. A mistura foi filtrada no *manifold* e transferidas para um béquer para a lavagem com água para a retirada dos reagentes remanescentes do processo de recobrimento. O material RACNT-BSA foi secado à 120° C por 12 h em estufa, triturado no grau e pistilo e transferidos para um frasco.

Figura 19- Representação esquemática do recobrimento dos CNT oxidados.



FONTE: Do autor.

#### 4.4 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO (ETAPA II)

Após a preparação e síntese dos materiais CNT, CNTox e RACNT-BSA descritos acima, passou-se à caracterização dos mesmos, utilizando as seguintes técnicas: Microscopia eletrônica de varredura com espectroscopia de energia dispersiva de raio X (MEV-EDS, do inglês *Scanning electron microscopy and energy-dispersive X-ray spectroscopy*), Microscopia eletrônica de transmissão (MET, do inglês *Transmission electron microscopy*), Análise termogravimétrica (TGA, do inglês *Thermogravimetric analysis*), Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR, do inglês *Fourier transform infrared spectroscopy*), Espectroscopia Raman e potencial zeta (PZ, do inglês *Zeta potencial*).

##### 4.4.1 MEV-EDS

As micrografias foram realizadas por um Microscópio eletrônico de varredura (FEG - Quanta 200 FEI, Japão), acoplado a um espectrômetro de raios-X de energia dispersiva (EDS). A amostra foi colocada sobre a superfície do *stub* coberta com fita de carbono dupla face, sem necessidade de cobertura por ouro. As análises foram realizadas no centro de microscopia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

##### 4.4.2 MET

O equipamento utilizado foi o Tecnai- G2-20-FEI Super Twin com tensão de 200 kV. Para a preparação das amostras, foram utilizadas grades de cobre recobertas com filme de carbono. As amostras foram dispersas em isopropanol e na sequência foram levadas em banho de ultrassom por 15 min (Unique – 154 W, 25 KHz) e posteriormente foram depositadas sobre as grades e secas a atmosfera ambiente por 24 h. As imagens de microscopia eletrônica de transmissão foram realizadas no centro de microscopia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

##### 4.4.3 Análise termogravimétrica (TGA)

As medidas TGA foram realizadas em um equipamento de análises simultâneas TG/DTA, (DTA, do inglês *differential thermal analysis*), modelo TG/DTA7300 da SII

Nanotechnology Inc, Japão. Amostras de aproximadamente 4 mg foram analisadas seguindo o protocolo: taxa de aquecimento de  $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$  em uma faixa de temperatura de 40 a  $1300^{\circ}\text{C}$  e sob atmosfera de ar sintético com fluxo de  $50\text{ mL min}^{-1}$  em suporte de amostra de alumina. As medidas foram realizadas no Laboratório de Análises Químicas de Fármacos, localizado na Universidade Federal de Alfenas-UNIFAL-MG.

#### 4.4.4 FTIR

Para a obtenção dos espectros com FTIR, utilizou-se um espectrofotômetro marca IRPrestige-21, modelo FTIR-8400S Shimadzu, na região de  $4000$  a  $750\text{ cm}^{-1}$ , com resolução espectral de  $4\text{ cm}^{-1}$ , adquiridos com 64 acumulações e empregando uma mistura mássica de KBr com concentração de amostra de 1% m / m. As medidas foram realizadas no Laboratório Interdisciplinar de Química - LabiQ, localizado na Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL - MG.

#### 4.4.5 Espetroscopia Raman

O espalhamento foi executado usando um *laser* com potência de 2 mW no comprimento de onda de 633 nm. Para cada espectro, foram feitas 5 varreduras de 10 s cada. As análises de espalhamento Raman foram realizadas em um equipamento da marca Senterra, Bruker, Alemanha, do Laboratório do Grupo de Tecnologias Ambientais do Departamento de Química da UFMG.

#### 4.4.6 PZ

Para as medidas de PZ, foram pesados aproximadamente 2 mg de cada material e adicionados em 5 mL em cada tampão preparado previamente com concentração de 50 mM. Os tampões utilizados foram: Fosfato em pH 2,5, 3,0 e 3,5 e acetato 4,0, 4,5, 5,0 5,5 e 6,0.

A maior dificuldade para a preparação das amostras, e que pode gerar erro de análise, é a concentração necessária adequada ao ensaio. Muitas vezes coletam-se os nanotubos que permanecem dispersos por mais tempo e não uma média significativa da amostra. Para tentar evitar estes problemas, as amostras de nanotubos foram preparadas fracionando-se uma pequena quantidade de material seco e promovendo a dispersão com

auxílio do ultrassom. Esta dispersão foi, por sua vez, fracionada ainda em agitação em concentrações menores até que se obtivessem amostras adequadas.

Utilizou-se o equipamento Zetasizer Nano ZS da marca Malvem Instruments, cubeta de poliestireno (modelo DTS1070) (Holanda), a 25 °C e em triplicata. O aparelho está localizado no departamento de farmácia (DEFAR) pertencente ao Laboratório do CiPharma da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP).

#### 4.5 ESTUDO CINÉTICO (ETAPA III)

No estudo cinético será descrito a metodologia dos experimentos de adsorção, aplicação dos modelos cinéticos e dessorção e reutilização dos materiais.

##### 4.5.1 Experimentos de adsorção

5 mg dos três diferentes adsorventes (CNT, CNTox. e RACNT-BSA) foram dispersos em 5 mL de solução aquosa de Fe (III) com concentração de 50 ppm, em pH 5,00. Em seguida, as suspensões foram mantidas em agitação contínua em *shaker* orbital a 150 rpm a 25 °C. Após atingir o equilíbrio de adsorção, as misturas foram filtradas com sistema *manifold* e bomba à vácuo. A concentração de íons ferro na solução foi determinada por espectrometria de absorção atômica por chama (FAAS, do inglês *Flame atomic Absorption Spectrometry*) (espectrofotômetro SpectrAA 220FS-Valerian).

Estes testes foram realizados em triplicata e os resultados são fornecidos com a média e desvio padrão dos valores. Testes controle foram realizados, nas mesmas condições experimentais, empregando apenas solução de íons Fe (III) na ausência de adsorventes.

A eficiência de remoção ( $R$ , %) e a capacidade de adsorção ( $q_e$ , mg g<sup>-1</sup>) foram calculados de acordo com as equações 14 e 15.

$$R = \frac{(C_0 - C_e) \cdot 100}{C_0} \quad (14)$$

$$q_e = \frac{(C_0 - C_e) \cdot V}{m} \quad (15)$$

onde  $C_o$  ( $\text{mg L}^{-1}$ ),  $C_e$  ( $\text{mg L}^{-1}$ ) são as concentrações de íon Fe (III) inicial e no equilíbrio, respectivamente;  $q_e$  ( $\text{mg g}^{-1}$ ) é a quantidade de íons adsorvidos por grama de material adsorvente;  $m$  (g) é a massa de adsorvente e  $V$  (L) é o volume de solução.

#### 4.5.2 Dessorção e reutilização dos materiais

Para a dessorção do íon Fe (III), os ensaios foram conduzidos conforme descrito a seguir: 5 mg de material foi disperso em 5 mL de solução de acetato de sódio com concentrações de 0,3, 0,5, 1,0 e 1,5  $\text{mol L}^{-1}$  com pH ajustado em 3,00 empregando soluções de NaOH e HCl a 0,1  $\text{mol L}^{-1}$ . As suspensões foram mantidas em agitação contínua em *shaker* orbital a 150 rpm por 12 h a 25 °C. Em seguida, as misturas foram filtradas com sistema *manifold* e bomba à vácuo. A concentração de íons Fe dessorvida foi determinada por FAAS.

A quantidade de metal dessorvido ( $q_{de}$ ) e o percentual de dessorção foram calculados de acordo com as equações 16 e 17 respectivamente:

$$q_{de} = \frac{C_1 \cdot V}{m} \quad (16)$$

$$d (\%) = \frac{q_{de} \cdot 100}{q_e} \quad (17)$$

onde  $q_{de}$  ( $\text{mg g}^{-1}$ ) é a quantidade de íons dessorvidos por grama de material adsorvente,  $V$  (L) é o volume de solução de dessorção,  $C_1$  ( $\text{mg L}^{-1}$ ) concentração de íons Fe (III) dessorvidos no sobrenadante e  $m$  (g) é a massa de material adsorvente.

Para o experimento de reuso dos três materiais à base de CNT testados neste estudo, realizaram-se consecutivos processos de adsorção/dessorção em modo batelada. Após cada etapa de adsorção/dessorção, os materiais foram lavados com água destilada, filtrados com sistema *manifold* e bomba à vácuo e dispersos em 25 mL de água destilada. As suspensões foram mantidas sob agitação contínua em um *shaker* orbital a 150 rpm a 25 °C por 24 h.

### 4.5.3 Estudo da cinética de adsorção

Para o estudo cinético de adsorção de Fe (III) nos três diferentes materiais (CNT, CNTox e RACNT-BSA), aplicaram-se aos dados experimentais os modelos de pseudo-primeira ordem (Eq. (3)), pseudo-segunda ordem (Eq. (7)) Quimissorção (Elovich) (Eq. (10)) e Ordem fracionária (Avrami) (Eq. (12)) e o modelo de difusão intrapartícula (Eq. (13)). As equações referentes a cada modelo estão representadas no quadro 14 e foram detalhadas no tópico 3.5.4 (TAN; HAMEED, 2017; WANG; GUO, 2020).

Quadro 14 - Modelos cinéticos e equações

Modelo cinético	Equação
Pseudo-primeira ordem	$q_t = q_e(1 - \exp^{-k_1 t})$
Pseudo-segunda ordem	$q_t = \frac{k_2 q_e^2 t}{1 + k_2 q_e^2 t}$
Quimissorção (Elovich)	$q_t = \frac{\ln(\alpha\beta)}{\beta} + \frac{\ln(t)}{\beta}$
Ordem fracionária (Avrami)	$q_t = q_e(1 - \exp^{-k_{av} t})^{n_{av}}$
Difusão intrapartícula	$q_t = k_{id} t^{1/2} + C$

FONTE: Do autor.

LEGENDA:  $q_e$  e  $q_t$  são: quantidades adsorvidas por grama de material adsorvente no equilíbrio e no tempo  $t$ , respectivamente ( $\text{mg g}^{-1}$ );  $k_1$  ( $\text{min}^{-1}$ ),  $k_2$  ( $\text{mg g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ) e  $k_{av}$  ( $\text{min}^{-1}$ ) são as constantes: da taxa de adsorção de pseudo-primeira ordem, taxa de adsorção de pseudo-segunda ordem e Avrami e  $\alpha$  ( $\text{mg g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ) é a taxa de adsorção inicial,  $\beta$  ( $\text{g mg}^{-1}$ ) e  $n_{av}$  é a constante relacionada com o mecanismo de adsorção e  $k_{id}$  é o coeficiente de difusão intrapartícula ( $\text{mg g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1/2}$ ). e  $C$  é a constante relacionada com a resistência à difusão ( $\text{mg g}^{-1}$ ).

Para a aplicabilidade dos modelos não lineares na cinética de adsorção, foram avaliados os coeficientes de determinação linear ( $R^2$ ) e utilizou-se o software OriginPro versão 9.0 (OriginLab®, Reino Unido). A fim de confirmar o melhor ajuste, os modelos foram avaliados estatisticamente com base na função de erro ( $F_{\text{erro}}$ ) (Eq. (18)) em que correlaciona-se a quantidade teórica de metal adsorvido pelos materiais com aquela mesurada experimentalmente, considerando o número de parâmetros dos modelos (TAN; HAMEED, 2017).

$$F_{\text{erro}} = \sqrt{\frac{1}{n-p} \sum_{i=1}^n (q_{\text{exp}} - q_{\text{cal}})^2} \quad (18)$$

onde  $n$  é o número de experimentos,  $p$  é o número de parâmetros do modelo,  $q_{exp}$  é o valor medido experimentalmente e  $q_{cal}$  é o valor teórico previsto pelo modelo.

A energia de Gibbs dos processos de adsorção empregando os três adsorventes testados neste estudo (CNT, CNTox e RACNT-BSA) foi determinada de acordo com a equação 19 (ZHAI *et al.*, 2020):

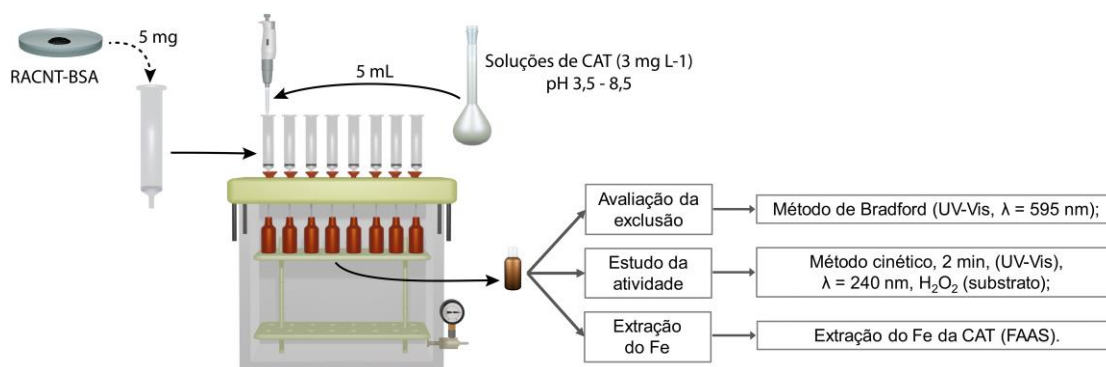
$$\Delta G = -RT \ln K_e \therefore K_e = \frac{C_{ad}}{C_e} \quad (19)$$

onde  $\Delta G$  é a variação da energia de Gibbs ( $\text{KJ mol}^{-1}$ ),  $R$  é a constante universal dos gases ( $8,314 \times 10^{-3} \text{ kJ. mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ ),  $T$  é a temperatura absoluta (298,15 K) e  $K_e$  é a constante de equilíbrio, determinada pela razão entre a concentração de íons Fe (III) adsorvido no material ( $C_{ad}$ ) e concentração de íons Fe (III) residual da solução ( $C_e$ ) (ZHAI *et al.*, 2020).

#### 4.6 ESTUDO DE INTERAÇÃO ENTRE RACNT-BSA E CAT (ETAPA IV)

Na quarta parte do trabalho foi descrito a metodologia de estudo da interação entre o RACNT-BSA e a proteína CAT. O esquema da Figura 20 descreve, de forma geral, como foi realizado o estudo.

Figura 20 - Esquema representativo da metodologia do estudo de interação entre o RACNT-BSA e CAT.



FONTE: Do autor.

Como mostra o esquema acima, alíquotas de mesmo volume coletadas, em cada pH, foi analisada para a avaliação da exclusão, atividade e extração de ferro da CAT. Cada metodologia será detalhada nos itens a seguir.

#### 4.6.1 Avaliação da exclusão de CAT pelo RACNT-BSA em relação ao pH

Para a avaliação da exclusão de proteínas pelo RACNT-BSA em relação ao pH, utilizou-se alíquotas diluídas das soluções de CAT com concentração aproximada de 3 mg mL<sup>-1</sup> em tampões (10 mM) no intervalo de valores de pH entre 3,5 e 8,5. Utilizou-se diferentes tampões nos seguintes intervalos: Para os valores de pH de 3,5 a 6,0 (tampão acetato), de 6,5 a 7,5 (tampão fosfato) e de 8,0 e 8,5 (Tampão TRIS-HCl). Em seguida, adicionou-se 5 mL da solução de CAT nos cartuchos de polipropileno, preenchidos com 5 mg de RACNT-BSA. O tempo de contato entre a solução de CAT e o RACNT-BSA foi de 30 min.

Após transcorrido o tempo, os percolados foram recolhidos e as concentrações da proteína foram determinadas em triplicata, utilizando-se um espectrofotômetro UV-Vis (Biochrom, modelo S22) no comprimento de onda de 595 nm, relativo à máxima absorção do complexo proteína-corante, empregando o método de Bradford (MARION, 1976). As concentrações de CAT foram determinadas nas soluções antes e após cada percolação.

Para o preparo do reagente de Bradford, foram pesados 50,0 mg do corante azul brilhante “*Comassie Brilhante Blue*” e dissolvidos em 12,5 mL de etanol 95%. Posteriormente, 50,0 mL de ácido fosfórico (85 % P.A.) foram adicionados sob constante agitação. Transferiu-se a solução para um balão volumétrico de 500 mL e completou-se o volume com água. A solução do reagente foi filtrada e estocada em frasco de vidro âmbar e guardada em geladeira (4° C).

#### 4.6.2 Estudo da atividade da CAT em relação ao pH.

O procedimento experimental para medida de atividade enzimática da CAT consistiu em adicionar-se a uma cubeta de quartzo 2,9 mL de solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 35 mM (preparada em tampão fosfato 100 mM, pH 7,5) e 0,2 mL da alíquota da solução enzimática em cada valor de pH estudado de 3,5 a 8,5. A absorbância da solução foi monitorada por 2 min no comprimento de onda de 240 nm, a fim de se determinar o coeficiente angular do trecho linear da curva absorbância *versus* tempo.

A atividade enzimática foi calculada pela Equação 20, em que a conversão de absorbância para concentração foi realizada utilizando-se a absorvidade molar do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (52,6 L mol<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>) e o volume reacional (3,1 mL) (NELSON; KIESOW, 1972).

$$Atividade (U) = \frac{1000 \left( \frac{\Delta Abs}{\Delta t} \right) V_r}{52,6} \quad (20)$$

onde:  $\Delta Abs/\Delta t$  é o coeficiente angular obtido do gráfico “absorbância *versus* tempo” e  $V_r$  é o volume reacional em mL.

#### 4.6.3 Extração do Ferro da CAT.

Preparou-se uma solução de CAT ( $3 \text{ mg L}^{-1}$ ) em tampões de pH 3,5 a 8,5 ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ). Em seguida, pesou-se 5 mg de RACNT-BSA e adicionou-se em cartucho de SPE. Após a coleta das soluções de CAT nos tampões estudados, realizou-se a percolação de 5 mL das soluções no cartucho e imediatamente as concentrações de íons Fe foram determinadas por FAAS.

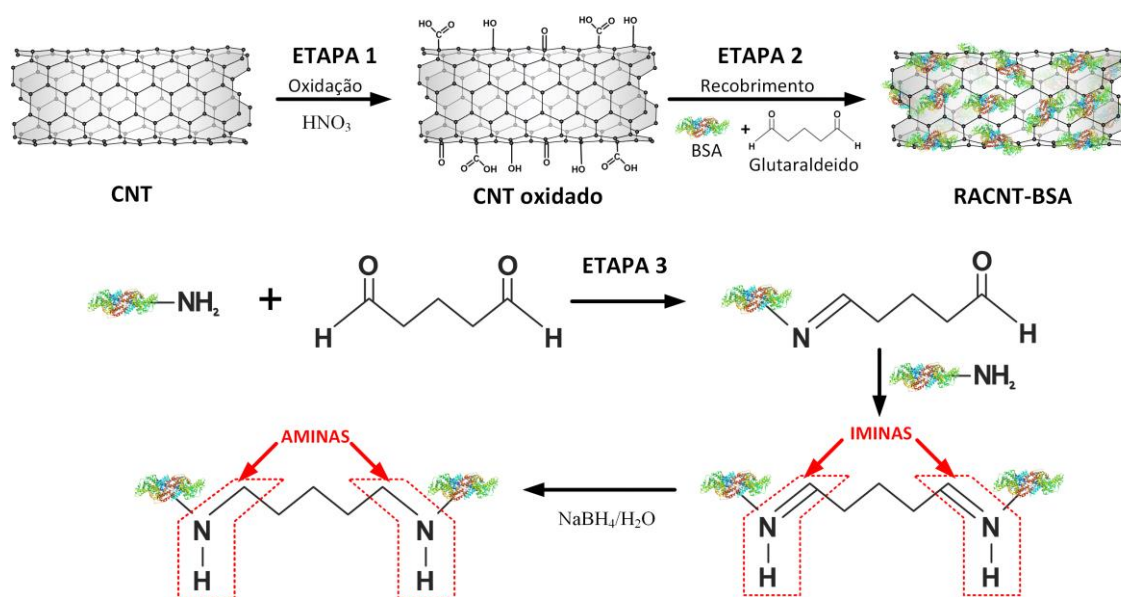
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussões deste trabalho são apresentados referentes ao preparo e síntese dos materiais (CNT, CNTox e RACNT-BSA) nos quais foram avaliados: a funcionalização (oxidação ácida) e o recobrimento do CNTox com BSA, com o intuito de aplicar esses materiais na adsorção de íon Fe em solução aquosa e a possível aplicação dos RACNT-BSA na extração de íon Fe (III) da CAT.

### 5.1 RECOBRIMENTO DOS CNT FUNCIONALIZADOS COM BSA (RACNT-BSA)

Na Figura 21 do procedimento experimental foi apresentado um esquema referente ao preparo dos RACNT-BSA, que foi dividido em três etapas: funcionalização dos CNT, imobilização ou recobrimento com proteína, formação das bases de Schiff, e por fim, a redução das iminas e dos grupos aldeídos residuais.

Figura 21 - Reação entre a BSA imobilizada e o glutaraldeído, e subsequente intercrossamento de ligações.



FONTE: Do autor.

A primeira etapa tem por finalidade, a funcionalização dos CNT, que por consequência gera grupamentos oxigenados superficiais que são de extrema importância na adsorção de íons metálicos. Na segunda etapa do preparo dos RACNT-BSA destacou-se o recobrimento do CNT ox com BSA e na sequência, a percolação do glutaraldeído

pelos CNT ox, tem por função reagir com as proteínas BSA, formando bases de Schiff (iminas). Adicionalmente, o glutaraldeído, que é uma molécula que apresenta grupos aldeídos em ambas terminações, liga-se às proteínas pelas duas extremidades, promovendo o intercrossamento entre as moléculas de BSA, conferindo maior estabilidade ao recobrimento e evitando perdas de proteínas na superfície do CNT ox (DE LIMA; CASSIANO; CASS, 2006).

As bases de Schiff formadas na terceira etapa podem sofrer hidrólise, bem como os grupos aldeídos residuais podem reagir com moléculas da amostra a ser utilizada. Assim, para que isso seja evitado, o borohidreto reduziu as iminas e os aldeídos, garantindo boa estabilidade e durabilidade do RACNT-BSA.

## 5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS

Após a preparação dos materiais CNT, CNTox e RACNT-BSA, passou-se à caracterização dos mesmos, utilizando-se as técnicas: MEV-EDS, MET, TGA, FTIR e PZ.

As técnicas de caracterização forneceram informações quanto à estrutura física e química dos nanomateriais (BELIN; EPRON, 2005), possibilitando compreender as diferenças entre os materiais quanto ao processo de oxidação ácida e recobrimento com BSA.

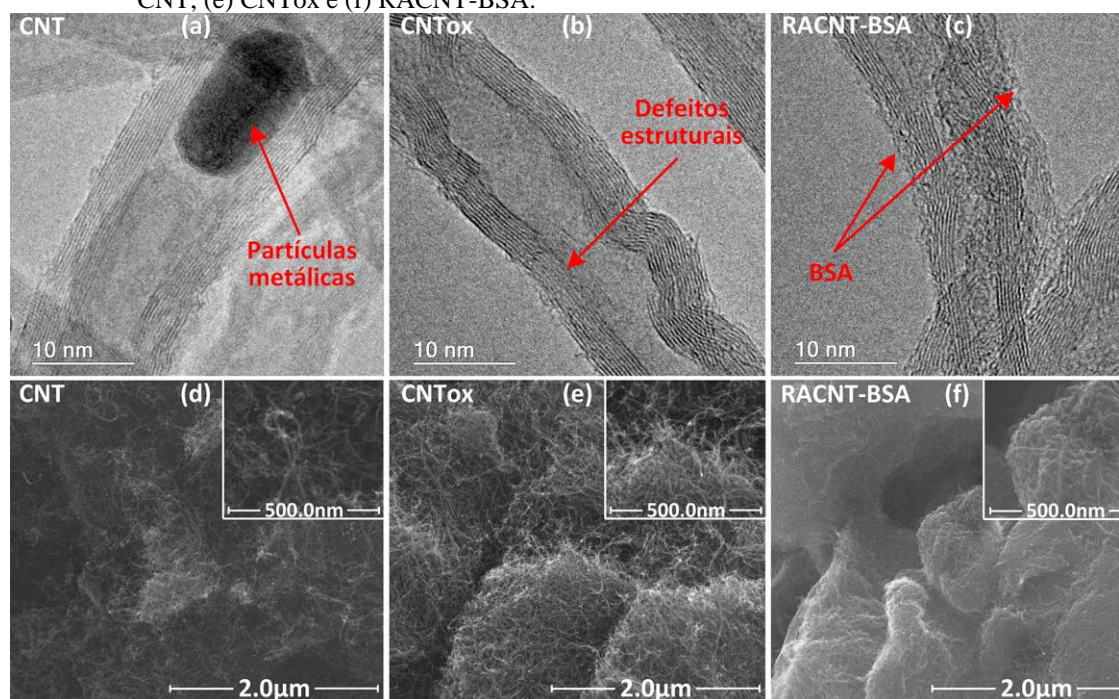
### 5.2.1 MEV-EDS e MET

As características morfológicas superficiais dos materiais CNT, CNTox e RACNT-BSA foram avaliadas por MET e MEV-EDS, conforme pode ser observado na Figura 22. De acordo com a figura 22a e 22b confirmou-se a espessura e o número de paredes. Na Figura 22a, foram analisados o material de CNT e destacaram-se as partículas metálicas (Fe, Ni, Co, dentre outras), pois estas são utilizadas como catalisadores para o crescimento dos CNT (ZHOU; SASAKI; KAWASAKI, 2014). Nos CNTox (Figura 22b), observaram-se possíveis defeitos superficiais irregulares, provavelmente decorrentes da oxidação ácida com HNO<sub>3</sub>. Esse método de oxidação (funcionalização), além de gerar grupamentos oxigenados superficiais, podem eliminar partículas metálicas pré-existentes do processo de sínteses (YANG *et al.*, 2019; ZHOU; SASAKI; KAWASAKI, 2014).

De acordo com as imagens de MEV (Figuras 22d e 22e), respectivamente CNT e CNTox, há diferença morfológica devido ao processo de oxidação ácida e pôde ser confirmada pelos dados experimentais por EDS (tabela 1), devido ao aumento da quantidade de oxigênio na superfície dos CNT, sugerindo a presença de grupos funcionais oxigenados (MESQUITA; MARTELLI; GORGULHO, 2006).

Para o processo de recobrimento do CNTox com BSA, observou-se uma superfície mais homogênea do material RACNT-BSA, e também pode ser confirmada por EDS, pois de acordo com a tabela 1, há um aumento na quantidade de nitrogênio na superfície. Portanto, as técnicas de MET e MEV-EDS permitiram avaliar a morfologia e a composição química dos materiais.

Figura 22 - Imagens de MET dos materiais: (a) CNT, (b) CNTox e (c) RACNT-BSA e MEV em (d) CNT, (e) CNTox e (f) RACNT-BSA.



FONTE: Do autor

Tabela 1 - Dados experimentais de EDS dos materiais CNT, CNTox e RACNT-BSA.

Elemento	Massa (%)		
	CNT	CNTox	RACNT-BSA
C	90,57	88,53	79,62
O	7,12	11,25	10,88
N	-	-	9,10
Outros elementos	2,31	0,22	0,40
Total	100,00	100,00	100,00

FONTE: Do autor.

### 5.2.2 Análise termogravimétrica (TGA)

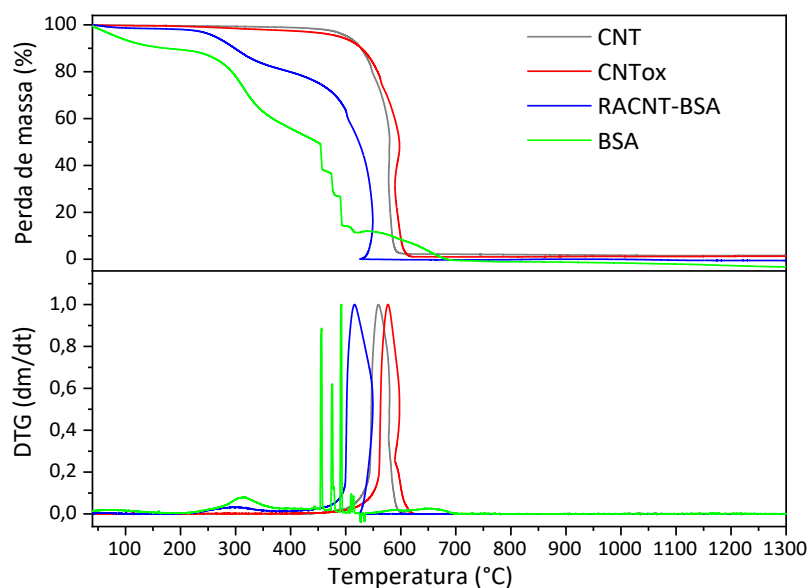
A estabilidade térmica foi investigada utilizando TGA e as curvas de TGA/DTGA estão representadas na Figura 23. Observando-se a DTGA dos materiais CNT e CNTox, obtiveram-se as temperaturas de decomposição de 559 e 577 °C, respectivamente.

A maior estabilidade térmica para o CNTox pode ser explicada pela remoção de impurezas remanescentes após o processo de síntese dos CNT. Essas partículas podem ser carbono amorfo, partículas grafíticas e catalisadores metálicos (LEHMAN *et al.*, 2011; YANG *et al.*, 2019).

Outro fator importante está relacionado ao número e forma do pico da curva da DTG, pois de acordo com a literatura, o número e a largura do pico estão relacionados com a homogeneidade do material, mostrando que o processo de oxidação resultou em um pico mais estreito, ou seja, um material mais homogêneo em relação ao CNT (TRIGUEIRO *et al.*, 2007).

Para o material RACNT-BSA observou-se uma perda de massa no intervalo de temperatura 300° - 315 °C. Esse intervalo coincide com a perda de massa para a amostra de BSA. Portanto, é possível confirmar o recobrimento de BSA na superfície dos CNTox.

Figura 23 - Curvas de TG/DTG dos materiais CNT, CNTox, RACNT-BSA e BSA.



FONTE: Do autor

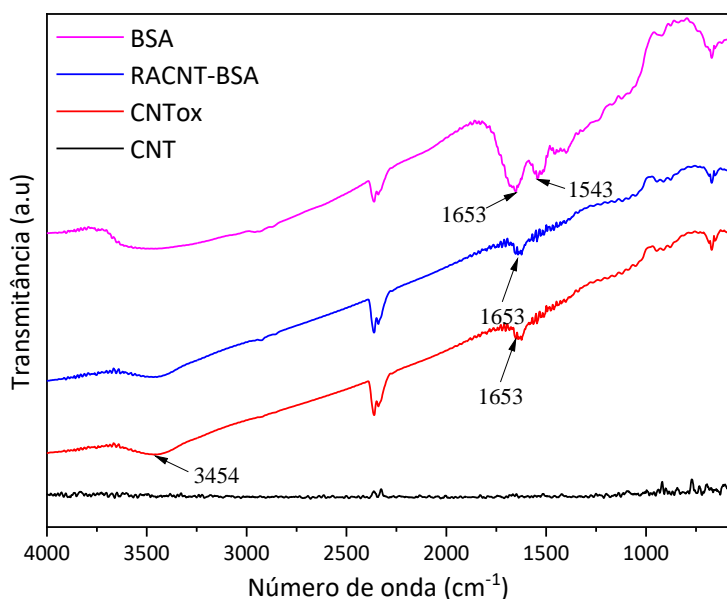
### 5.2.3 FTIR

De acordo com os dados experimentais de espectroscopia no infravermelho na Figura 24, o CNT não apresentou modos vibracionais, uma vez que o momento de dipolo gerado neste tipo de material, com poucos defeitos ou modificação química, é bastante fraco ou inexistente, podendo também estar relacionado com a elevada absorção da radiação desses materiais (KIM; NEPAL; GECKELER, 2005).

Para o CNTox e RACNT-BSA, estes apresentaram bandas de deformação axial de ligação C=O de cetonas em  $1650\text{ cm}^{-1}$  (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005). A região que varia entre  $3200$  a  $3500\text{ cm}^{-1}$  pode ser atribuída ao estiramento de ligação O-H de álcool, fenol ou ácido carboxílico ou pode ser devido água adsorvida nos materiais (KIM *et al.*, 2005).

Em relação ao espectro da BSA, destaca-se a banda de amida I observada em  $1653\text{ cm}^{-1}$  e possui uma forte contribuição de estiramento da ligação C=O e amida II (deformação angular de N-H e estiramento de ligação C-N) em  $1543\text{ cm}^{-1}$ . A definição dessas bandas pode indicar uma perda de liberdade conformacional da BSA após a interação com os CNTox (BARTH, 2007; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005).

Figura 24 - Espectros de infravermelho dos materiais CNT, CNTox, RACNT-BSA e BSA.



FONTE: Do autor

### 5.2.4 Espetroscopia Raman

Apesar da espectroscopia Raman ser uma técnica fundamental para a compreensão das propriedades eletrônicas, ópticas e vibracionais dos materiais (BELIN; EPRON, 2005; DRESSELHAUS; JORIO; SAITO, 2010), é pouco capaz de identificar com clareza os grupos funcionais presentes nas superfícies dos CNT (KIM *et al.*, 2005).

Entretanto, vários trabalhos reportaram que o grau de funcionalização, dos CNT, pode ser avaliado a partir dos espectros Raman (ZHOU *et al.*, 2002; ZHOU; SASAKI; KAWASAKI, 2014). O termo grau de funcionalização é utilizado para quantificar a desordem na monocamada de grafeno, neste caso, induzida pela introdução de grupos funcionais na superfície das paredes dos CNT, a qual é quantificada pela razão das alturas (intensidades Raman) entre a banda D (relacionada à desordem e defeitos estruturais de ligação C-C do tipo  $sp^3$ ) e a banda G (relacionada à vibração tangencial da ligação C-C do tipo  $sp^2$ ) (KIM *et al.*, 2005).

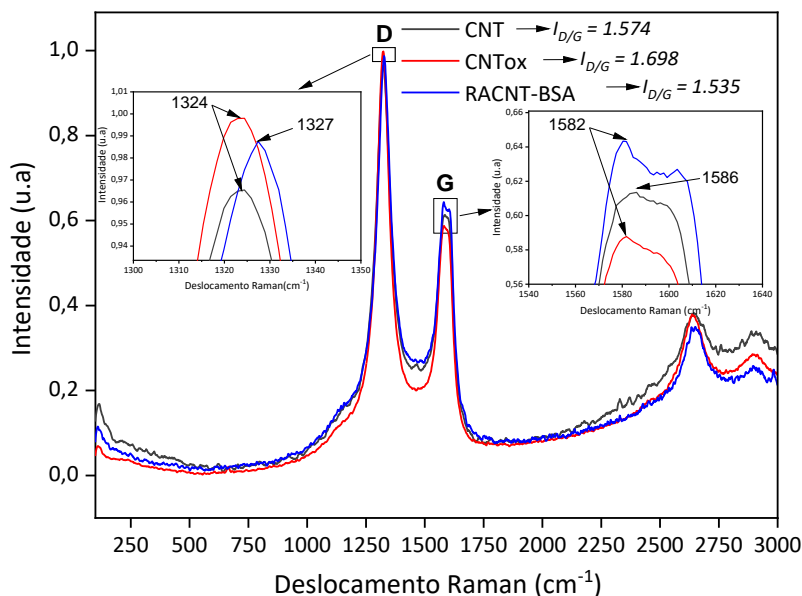
Um aumento do valor da razão entre as intensidades D e G ( $I_{D/G}$ ), corresponde a uma proporção de carbono  $sp^3$ , que pode ser geralmente atribuída à presença de defeitos estruturais na parede dos CNT decorrente da funcionalização ácida (FLAHAUT; LAURENT; PEIGNEY, 2005).

Na Figura 25, após a modificação química dos CNT resultando nos CNTox, foi observado um aumento na intensidade Raman da banda D em  $\sim 1324\text{ cm}^{-1}$  e diminuição da banda G em  $\sim 1582\text{ cm}^{-1}$ . Assim, para estimar o grau de funcionalização, foi calculada a razão entre as intensidades das bandas D e G. Analisando as intensidades relativas os valores de  $I_{D/G}$  dos materiais, observou-se que após a modificação química ácida, o valor desta razão aumentou de 1,574 no CNT para 1,698 no CNTox. Estes valores confirmaram um alto grau de funcionalização do material CNTox, pois, através da alteração da sua estrutura eletrônica devido à modificação química, houve a quebra de algumas ligações e a inserção dos grupamentos químicos oxigenados na superfície dos CNT (FLAHAUT; LAURENT; PEIGNEY, 2005; KIM *et al.*, 2005).

Comparando a  $I_{D/G}$  do RACNT-BSA em relação aos materiais CNT e CNTox, o valor de 1,535 foi o menor. Este resultado pode estar relacionado com o recobrimento dos CNTox com a BSA, pois, com a interação entre grupos funcionais oxigenados, gerados na superfície dos CNTox e a BSA, ocorreu uma diminuição dos defeitos estruturais da ligação C-C do tipo  $sp^3$  favorecido por interações  $\pi$ - $\pi$  que ocorrem entre elétrons

deslocalizados na superfície dos CNT com resíduos aromáticos da BSA como os triptofanos (LOU *et al.*, 2016).

Figura 25 - Espectros Raman dos materiais CNT, CNTox e RACNT-BSA.



FONTE: Do autor

### 5.2.5 PZ

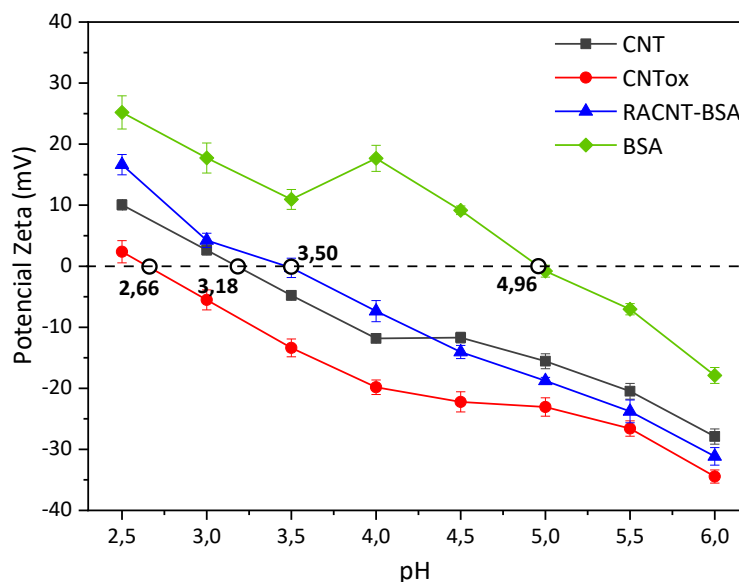
A partir das medidas de potencial zeta dos materiais, apresentada na Figura 26, foi possível avaliar a distribuição de cargas superficiais.

O ponto isoelétrico (pI) do material CNTox (2,66), mostrou-se menor em relação ao CNT (3,18), confirmando o processo de oxidação e um possível aumento na presença de grupos ácidos oxigenados negativos na superfície dos CNT, destacando-se ácidos carboxílicos, lactonas e fenóis (MESQUITA; MARTELLI; GORGULHO, 2006).

Para o RACNT-BSA, o pI foi mais elevado com o valor de 3,50, podendo estar relacionado com o bloqueio das cargas negativas presentes na superfície do CNT pelas moléculas de BSA, através das interações eletrostáticas das cargas negativas do CNTox com os grupos amino protonados dos resíduos lisina e arginina da estrutura da proteína. Também é importante notar que a BSA (pI 4,96) superficial do RACNT-BSA contribuiu para o aumento do pI do material. Estes resultados serão fundamentais para avaliação da

capacidade adsorviva dos materiais e prever os possíveis mecanismos que podem ocorrer entre esses materiais adsorventes e os íons metálicos de Fe (III).

Figura 26 - Potencial Zeta dos materiais CNT, CNTox, RACNT-BSA e BSA.

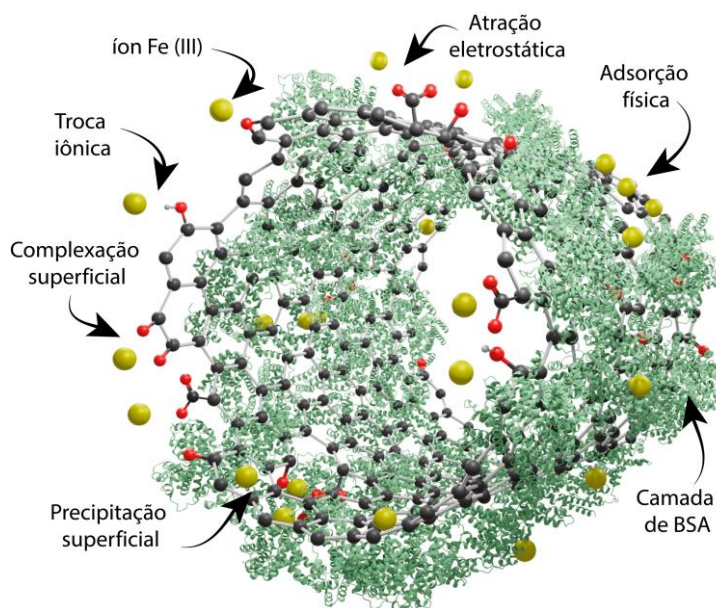


FONTE: Do autor

Portanto, com base nos pIs dos materiais CNT (2,66), CNTox (3,18) e RACNT-BSA (3,5), em valores de pH acima de 3,5, as superfícies desses materiais ficam carregadas negativamente, prevalecendo as interações eletrostáticas atrativas com os íons Fe (III) e favorecendo o estudo de adsorção.

A Figura 27 apresenta vários mecanismos que podem ocorrer simultaneamente entre íons Fe (III) e os grupos funcionais oxigenados gerados na superfície dos CNT pela oxidação ácida (DUAN *et al.*, 2020). Além das interações eletrostáticas, outros mecanismos podem ocorrer simultaneamente como troca iônica e complexação. Já a precipitação superficial e adsorção física, ocorrem com menos frequência na presença de outros grupos funcionais gerados por distintos processos de funcionalização ou na presença de adsorvente com elevada porosidade (DUAN *et al.*, 2020; YANG *et al.*, 2019).

Figura 27 - Mecanismos de interação entre o RACNT-BSA e íon Fe (III).



FONTE: Do autor

### 5.3 ESTUDO CINÉTICO

Neste tópico será avaliado o efeito do tempo de contato no processo de adsorção de Fe (III), cinética de adsorção e mecanismos de interações e o estudo de dessorção e regeneração dos materiais.

#### 5.3.1 Efeito do tempo de contato no processo de adsorção de Fe (III) nos materiais

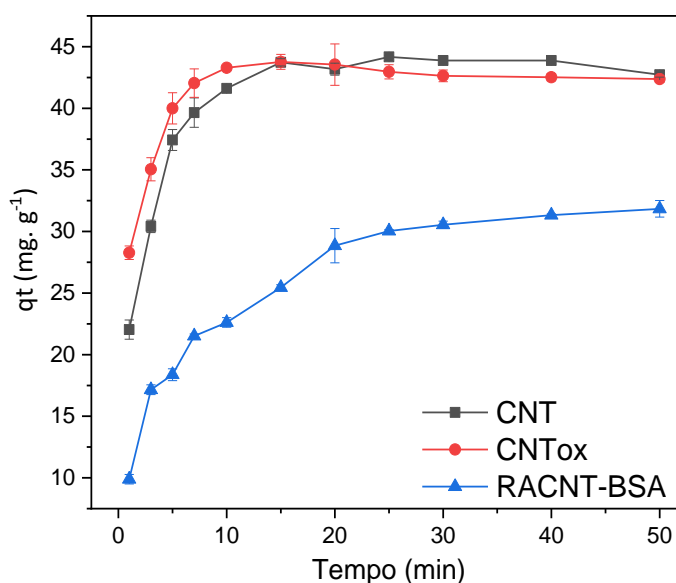
Considerando o intervalo de variação dos pIs dos materiais entre 2,6 e 3,5 e que a precipitação de íons Fe (III) como hidróxido de ferro ocorre em valores de pH superiores a 5,0, a faixa possível para a adsorção foi no intervalo de pH 3,5 a 5,0 (SAMADANI LANGEROODI; FARHADRAVESH; DEHNO KHALAJI, 2018). Um intervalo muito curto para os estudos de adsorção em função do pH. Desta forma, o valor de pH foi fixado em 5,0 por ser o valor mais distante dos pIs dos materiais, favorecendo assim a adsorção de íons Fe (III) pelas interações eletrostáticas e a não precipitação de ferro na forma de hidróxidos. Além disso, não foi avaliada a força iônica porque o objetivo principal foi avaliar a interação ferro-material sem qualquer outra variável, em termos de estudos cinéticos e termodinâmicos. Claro que, estudos futuros podem ser realizados para otimizar os melhores parâmetros de adsorção, como por exemplo, força iônica.

A Figura 28, mostra a eficiência de adsorção de íons Fe (III) dos três diferentes materiais (CNT, CNTox e RACNTBSA) em relação ao tempo de contato.

Observam-se que os processos de adsorção empregando os materiais CNT e CNTox alcançaram os equilíbrios após 15 e 10 min de contato e capacidade de adsorção ( $43,73 \pm 0,29$  e  $43,29 \pm 0,11$ )  $\text{mg g}^{-1}$ , respectivamente.

Para o RACNTBSA o equilíbrio foi alcançado após 40 min de contato e a capacidade de adsorção foi de  $(31,55 \pm 0,29)$   $\text{mg g}^{-1}$ .

Figura 28 - Efeito do tempo de contato de entre os íons Fe (III) e os materiais: CNT, CNTox e RACNT-BSA.



FONTE: Do autor.

A eficiência de adsorção dos materiais CNT e CNTox foram similares e este resultado mostrou que a modificação química empregando o ácido nítrico, não alterou significativamente a capacidade de adsorção.

Outro fator importante foi a utilização de uma oxidação mais branda empregando uma solução de  $\text{HNO}_3$  ( $2,6 \text{ mol L}^{-1}$ ), pois com essa concentração, poucos defeitos estruturais são gerados na superfície dos CNT, confirmado pelos espectros de Raman e de infravermelho (AVILÉS *et al.*, 2009; IHSANULLAH *et al.*, 2016; SRIVASTAVA, 2013).

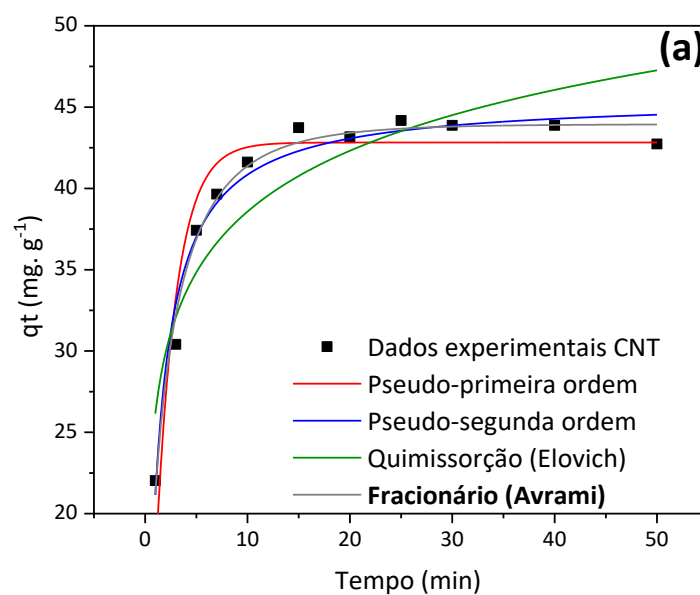
A menor capacidade de adsorção para o RACNT-BSA, provavelmente está relacionada com a camada de BSA que recobre o material, pois essa camada pode dificultar o acesso dos íons Fe (III) às regiões com sítios ativos da superfície dos CNT.

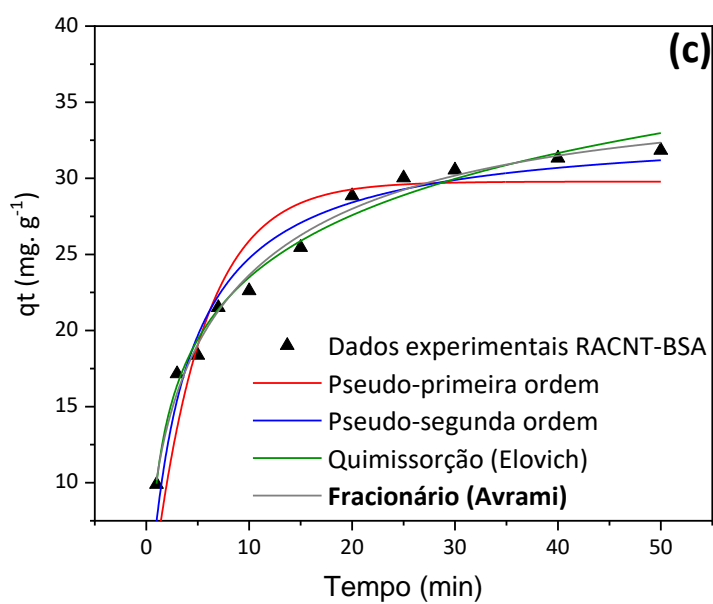
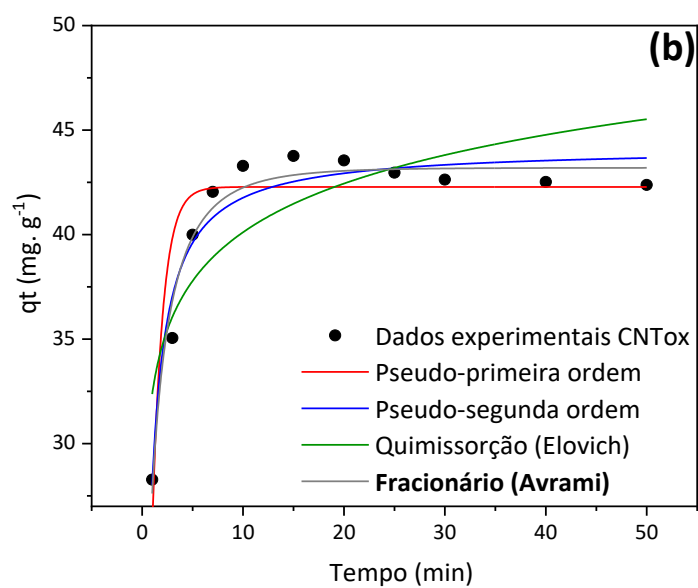
Além disso, os íons metálicos podem interagir com a camada externa de BSA (ZHAO *et al.*, 2015). Por outro lado, a camada de BSA é a responsável pela exclusão das proteínas, isto é, as proteínas não adsorvem no material revestido.

### 5.3.2 Cinética de adsorção e mecanismos de interações

Para avaliar o efeito da modificação química nos processos adsorptivos dos materiais e obter informações dos tipos de interações ocorridas, utilizaram-se os modelos cinéticos não lineares de pseudo-primeira ordem, pseudo-segunda ordem e quimissorção (Elovich) e fracionário (Avrami), (Fig. 29).

Figura 29 - Dados experimentais de adsorção de íons Fe (III) nos materiais: (a) CNT, (b) CNTox e (c) RACNT-BSA e modelos cinéticos.





FONTE: Do autor.

Os parâmetros cinéticos de cada modelo foram avaliados pelo coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e a função de erro F representadas na tabela 2.

Tabela 2 - Parâmetros dos modelos cinéticos de adsorção e valores de função de erro e coeficiente de determinação.

Concentração de Fe (III) (50 ppm)	Parâmetros	Material		
		CNT	CNTox	RACNT-BSA
Pseudo-primeira ordem	$q_e$ (mg g <sup>-1</sup> )	42,8220	42,2808	29,7830
	$k_1$ (min <sup>-1</sup> )	0,5003	0,9487	0,2035
	$F_{\text{erro}}$	2,0885	1,8490	2,3461
	$R^2$	0,9037	0,8348	0,8800
Pseudo-segunda ordem	$q_e$ (mg g <sup>-1</sup> )	45,5575	44,1681	33,3607
	$k_2$ (min <sup>-1</sup> )	0,0190	0,0393	0,0086
	$F_{\text{erro}}$	1,1227	1,0967	1,3598
	$R^2$	0,9722	0,9419	0,9597
Quimissorção (Elovich)	$\alpha$ (mg g <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	685,3218	50994,2395	31,8315
	$\beta$ (mg <sup>-1</sup> )	0,1853	0,2974	0,1698
	$F_{\text{erro}}$	2,7020	2,4402	0,8133
	$R^2$	0,8388	0,7123	0,9856
Fracionário (Avrami)	$q_e$ (mg g <sup>-1</sup> )	43,9461	43,1967	34,9933
	$k_{av}$ (min <sup>-1</sup> )	0,5170	1,0339	0,1259
	$n_{av}$ (min <sup>-1</sup> )	0,6354	0,5739	0,5153
	$F_{\text{erro}}$	3,1536	2,7640	6,0287
	$R^2$	0,9860	0,9657	0,9887

FONTE: Do Autor.

NOTA: Condições experimentais: Temperatura fixada em 25 °C, massa de adsorvente: 10 mg, 10 mL de solução de Fe (III) concentração de 50 mg L<sup>-1</sup> em pH 5,00; Parâmetro dos modelos cinéticos:  $q_e$  (mg.g<sup>-1</sup>) é quantidades adsorvidas por grama de material adsorvente no equilíbrio e no tempo  $t$ ,  $k_1$  (min<sup>-1</sup>),  $k_2$  (mg.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) e  $k_{av}$  (min<sup>-1</sup>) são as constantes da taxa de adsorção de pseudo primeira ordem e taxa de adsorção de pseudo-segunda ordem e Avrami,  $\alpha$  (mg.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) é a taxa de adsorção inicial e  $\beta$  (g.mg<sup>-1</sup>).  $F_{\text{erro}}$  é a Função de erro e  $R^2$  é o coeficiente de determinação.

O modelo de Avrami (ordem fracionária) foi o que melhor se ajustou para os dados experimentais para os materiais, com base nos valores dos coeficientes de determinação ( $R^2$ ) e a função de erro ( $F_{\text{erro}}$ ) (Equação 18), conforme apresentado na Tabela 2. Portanto, a adsorção de íons Fe(III) na superfície desses materiais pode ser governada por diferentes mecanismos baseados em interações físicas (fissorção) e químicas (quimissorção) (ALIMOHAMMADY *et al.*, 2018; VENKATA RAMANA; YU; SESHIAH, 2013). Esta multiplicidade é consequência da heterogeneidade das superfícies das partículas, expressa pelo modelo de Avrami (GAY *et al.*, 2010).

Os modelos cinéticos de adsorção propostos, reportados acima, não são capazes de descrever as etapa que controla o processo de processo de adsorção em um sistema sólido-líquido (ALVES *et al.*, 2017; TAN; HAMEED, 2017). Dessa forma, torna-se necessário o ajuste do modelo de difusão intrapartícula, proposto por Weber e Morris (1963) aos dados experimentais obtidos para avaliação da etapa controladora no processo de adsorção (KUMAR *et al.*, 2011; TAN; HAMEED, 2017; WEBER; MORRIS, 1963).

De acordo com este modelo, os mecanismos de adsorção ocorrem por três etapas principais: I) Difusão externa (adsorção na superfície externa), (II) Difusão intrapartícula (adsorção nos poros) e (III) equilíbrio, na qual a difusão intrapartícula começa a atenuar-se devido à baixa concentração do soluto em solução (TAN; HAMEED, 2017; TRAN *et al.*, 2017; WEBER; MORRIS, 1963).

Os ajustes deste modelo aos dados experimentais podem ser observados na Figura 30. Os valores das constantes ( $k_{id}$  e  $C$ ) e os valores de coeficientes de correlação ( $R^2$ ) estão sumarizados na Tabela 3.

Os valores de coeficiente linear obtidos mostraram que as retas ajustadas aos dados experimentais não passaram pela origem, para os três adsorventes avaliados. Estes resultados indicam que o processo de adsorção foi controlado pela difusão dos íons na película estagnada na superfície externa do adsorvente e pela adsorção nos poros do material (difusão intrapartícula).

Para os materiais CNT e CNTox, foram predominantes os mecanismos de difusão externa e difusão intrapartícula. No entanto, para o RACNT-BSA ocorreu preferencial adsorção na sua parte externa seguida da condição de equilíbrio. Isto se deve aos diferentes procedimentos de preparação destes materiais.

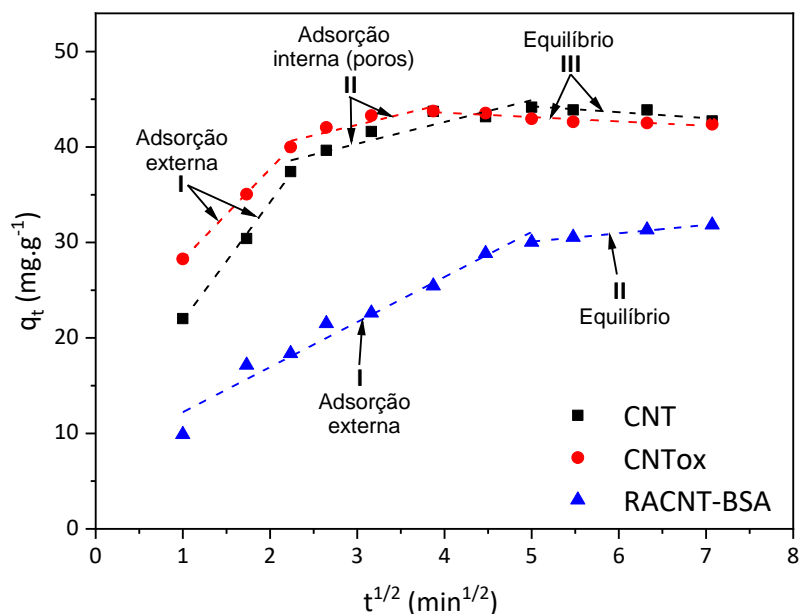
Os CNT e CNTox, podem apresentar uma maior área superficial específica, que permite adsorver íons Fe (III) nas suas diferentes interfaces (interna e externa). Entretanto, maior capacidade de adsorção da ordem de  $40 \text{ mg g}^{-1}$  foi obtida (ver Figura 30 – primeiro estágio do processo de adsorção). Após a saturação da face externa destes materiais, uma fração dos íons da ordem de  $5 \text{ mg g}^{-1}$  foi adsorvida nos poros dos materiais (segundo estágio do processo de adsorção). Em seguida, foi alcançado o equilíbrio.

Para o material RACNT-BSA, pôde-se observar apenas 2 estágios de adsorção. Isto pode ser devido à obstrução dos poros do material por moléculas de proteína e/ou moléculas do reticulante (glutaraldeído) que reduziram drasticamente o diâmetro dos poros. Dessa forma, os íons foram adsorvidos na superfície externa deste material. Além disso, este processo de adsorção pode ser devido à preferencial adsorção dos íons Fe (III) aos grupos carregados negativamente (carboxilato) presentes nos resíduos glutamato, aspartato e carbóxi terminal da BSA (ALVES *et al.*, 2017). Após a saturação dos sítios de adsorção na superfície externa do material, foi alcançado o equilíbrio.

Estes resultados confirmaram o recobrimento da superfície dos materiais com moléculas de BSA e a forte influência na cinética e os mecanismos de adsorção. Embora este material revestido tenha reduzido a capacidade de adsorção dos íons, se comparado

com CNT e CNTox, ele é bastante atrativo para processos de regeneração do adsorvente, em bateladas sucessivas de reuso, porque pode possibilitar maior capacidade de dessorção.

Figura 30 - Modelo de difusão intrapartícula de Weber e Morris aplicado à adsorção de Fe (III) em solução (50 ppm) para os materiais CNT, CNTox e RACNT-BSA.



FONTE: Do autor

Tabela 3 - Parâmetros de difusão intrapartícula.

Material	Etapas	$C_{ad}$	$k_{id}$	$R^2$
CNT	I	9,42	12,39	0,9971
	II	33,44	2,30	0,8631
	III	47,49	-0,64	0,7780
CNTox	I	18,80	9,44	0,9995
	II	35,64	2,33	0,8608
	III	45,41	-0,46	0,8778
RACNT-BSA	I	7,54	4,71	0,9624
	II	25,69	0,87	0,9919

FONTE: Do autor.

NOTA: Condições experimentais: Temperatura fixada em 25 °C, massa de adsorvente: 10 mg, concentração de 50 mg. L<sup>-1</sup> de Fe (III) em pH 5,00; Parâmetros de difusão intrapartícula:  $C_{ad}$  é a constante relacionada com a resistência à difusão (mg. g<sup>-1</sup>),  $k_{id}$  é o coeficiente de difusão intrapartícula (mg. g<sup>-1</sup> min<sup>-1/2</sup>).

Para avaliar as diferenças dos processos adsorptivos dos materiais, foi calculada a energia de Gibbs ( $\Delta G_{ads}$ ), pois este parâmetro termodinâmico permite avaliar o quanto esses processos adsorptivos, à uma determinada temperatura, ocorrem de forma espontânea

(valores negativos) ou não espontâneo (valores positivos) (KOŃCZYK; ŻARSKA; CIESIELSKI, 2019).

De acordo com os resultados representados na tabela 4, os valores de  $\Delta G_{ads}$ , mais negativos para os materiais CNT e CNTox, confirmaram maior espontaneidade na adsorção dos íons nestes materiais quando comparados com o material (RACNT-BSA).

Este fenômeno pode estar relacionado com a redução da área superficial do RACNT-BSA, devido à presença das moléculas de BSA na superfície. Processos de adsorção com valores de  $\Delta G_{ads}$  até  $-20 \text{ kJ mol}^{-1}$  indicam que a fisissorção (adsorção física) prevalece em comparação com a quimissorção (adsorção química). Portanto, a adsorção de íons Fe (III) na superfície desses materiais ocorre, principalmente, por interações físicas (BABARINDE *et al.*, 2013; XU *et al.*, 2018).

Como os processos adsorptivos envolvem vários mecanismos de interação, ao mesmo tempo na superfície dos adsorventes, a quimissorção também pode ser considerada, porém em menor proporção, conforme relatado acima.

Tabela 4 - Parâmetros termodinâmicos para adsorção de Fe (III) nos materiais CNT, CNTox e RACNT-BSA.

Material	$K_e$	$C_e$ (mg mL <sup>-1</sup> )	$\Delta G$ (KJ mol <sup>-1</sup> )
CNT	170,175	0,256	-12,7340
CNTox	65,330	0,658	-10,3607
RACNTBSA	9,358	3,338	-5,5434

FONTE: Do autor.

NOTA: Constante de equilíbrio ( $K_e$ ), concentração de Fe (III) residual remanescente em solução ( $C_e$ ) e variação da energia de Gibbs ( $\Delta G$ ).

Portanto, essas interações reversíveis permitem estudos de dessorção de íons Fe (III) por diferentes mecanismos. Assim, é possível a reutilização desses adsorventes, em sucessivos ciclos de adsorção/dessorção.

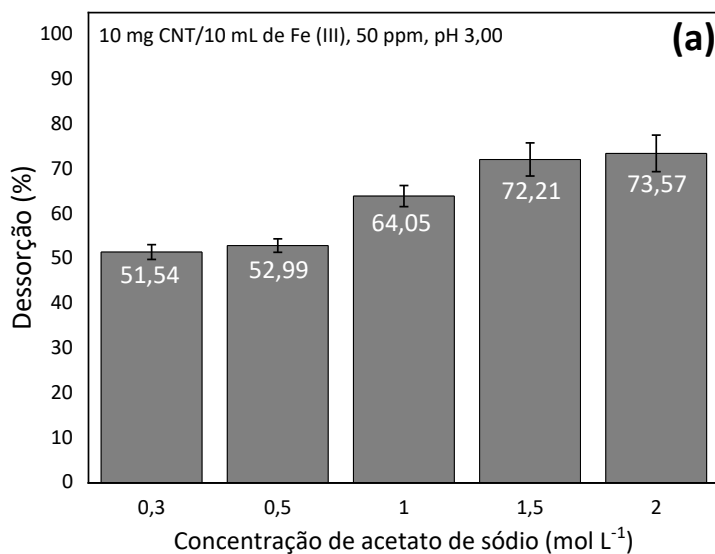
### 5.3.3 Estudos de dessorção e regeneração

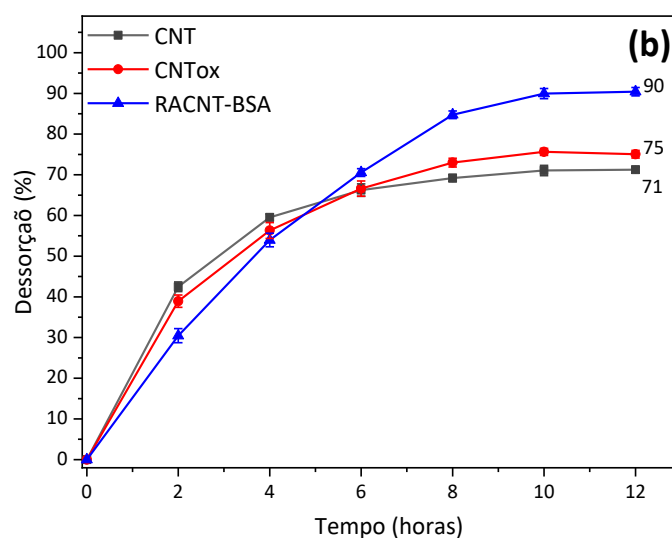
O estudo de regeneração (dessorção) dos adsorventes é de suma importância do ponto de vista econômico, pois os adsorventes podem ser empregados mais de uma vez nos processos adsorptivos (EGBOSIUBA *et al.*, 2021). Como relatado, agentes oxidantes fortes, com ácido nítrico, perclóricos e sulfúricos normalmente são utilizados na dessorção de íons metálicos (CHATTERJEE; ABRAHAM, 2019).

Para a dessorção, utilizaram-se soluções de acetato de sódio, em pH ajustado em 3,0, com concentrações molares de 0,3 a 2,0 mol L<sup>-1</sup>. De acordo com a figura 31a, a solução com concentração de 1,5 mol L<sup>-1</sup> foi selecionada como condição de trabalho para os estudos de dessorção para os materiais CNT, CNTox e RACNT-BSA.

A influência do tempo no processo de dessorção foi avaliada e os resultados são mostrados na figura 31b. A dessorção/eluição foi mais eficiente para o RACNT-BSA (90%) seguido do CNT (71%) e CNTox (75%). Portanto, a facilidade de dessorção de íons Fe (III) dos RACNT-BSA em comparação com o CNT e CNTox corrobora com a predominância das interações de natureza física (fisissorção) e pode ser evidenciada pelo parâmetro termodinâmico ( $\Delta G_{ads}$ ) nos estudos dos processos adsorptivos para os materiais (tabela 4).

Figura 31 - (a) Efeito da concentração de acetato de sódio na dessorção de Fe (III) material CNT e (b) Eficiência de dessorção dos materiais CNT, CNTox e RACNT-BSA.





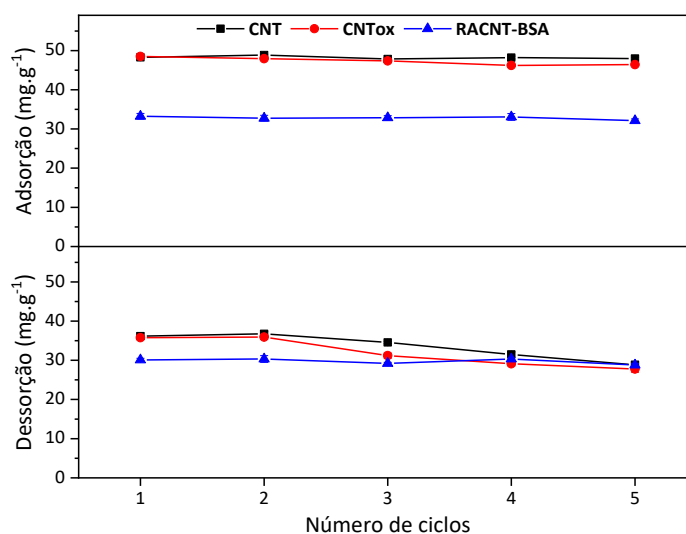
FONTE: Do autor

A reutilização dos materiais foi investigada, por cinco ciclos sucessivos de adsorção/dessorção, empregando a solução eluente de acetato de sódio  $1,5 \text{ mol L}^{-1}$ , previamente selecionada para a realização deste estudo (Figura 32).

De acordo com os resultados, a quantidade de íons Fe (III) dessorvidos, dos materiais CNT e CNTox, diminuiu gradualmente com o aumento do número de ciclos, com perda de eficiência de até 15 %, após os cinco ciclos.

Já para o material RACNT-BSA, a eficiência de regeneração de 90% se manteve constante durante todos os ciclos. Portanto, este resultado mostra claramente que o recobrimento de CNT com BSA não só modifica a cinética e o mecanismo de adsorção, mas também o processo de regeneração. Assim, estes adsorventes podem ser extremamente atrativos em processos industriais, por possuir uma elevada capacidade de regeneração (DUAN *et al.*, 2020; EGBOSIUBA *et al.*, 2021; YANG *et al.*, 2019). Essas características contribuem diretamente para uma boa acessibilidade desses materiais para os processos de adsorção frente a íons metálicos.

Figura 32 - Ciclos de reutilização de adsorção/dessorção  
Dos materiais CNT, CNTox e RACNT-BSA.



FONTE: Do autor

Apesar do elevado potencial desses materiais na aplicação na adsorção de metais a partir de soluções aquosas (DE FARIA *et al.*, 2017; FIYADH *et al.*, 2019; SINGH *et al.*, 2021), este estudo confirmou a importância das modificações superficiais (oxidação e recobrimento com BSA) e podem ser amplamente aplicados na adsorção de metais para outras metodologias

Destacou-se a versatilidade dos RACNT-BSA em comparação com os CNT e CNTox, devido à sua capacidade em extrair metais diretamente em matrizes complexas de fluidos biológicos sem a etapa prévia dos processos de digestão ácida (BARBOSA *et al.*, 2015, 2016). A camada BSA é fundamental para esta aplicação, uma vez que esta camada repele eletrostaticamente as proteínas da amostra em valores extremos de valores de pH maiores ou menores que o pI das proteínas, em um mecanismo já bastante consolidado na literatura e será mais detalhado no próximo tópico (GOMES *et al.*, 2016).

Como destacado na revisão da literatura (Quadro 12), os RACNT-BSA têm sido utilizados de forma eficiente para diferentes aplicações ( $\text{Cd}^{2+}$  e  $\text{Pb}^{2+}$  em amostras de soro humano (BARBOSA *et al.*, 2015, 2016), e  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$  em amostras de soluções proteicas (BALDUINO *et al.*, 2019). Assim, os estudos de mecanismos de adsorção e interação, propostos neste trabalho serão fundamentais para aplicações desse material como suporte adsorvente em extração de Fe ou outros metais em matrizes complexas.

Portanto, a partir dessa parte do trabalho, o foco será na aplicação dos RACNT-BSA na extração de íons Fe (III), a partir de uma solução aquosa com elevada

concentração proteica de CAT e verificação da possibilidade de produção de apoproteínas.

#### 5.4 ESTUDO DE INTERAÇÃO ENTRE O RACNT-BSA E A PROTEÍNA - CAT

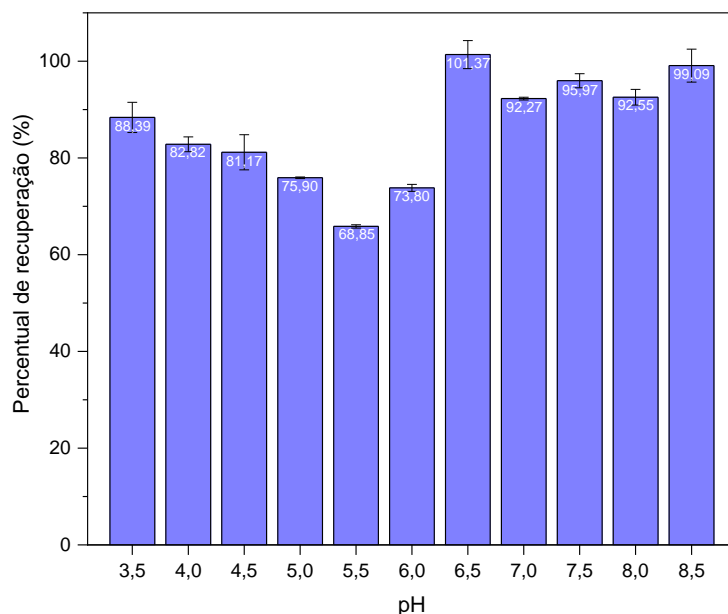
As técnicas de caracterização dos materiais e os estudos cinéticos dos mesmos empregando os íons Fe (III), propiciaram relacionar esses fatores no estudo da interação entre o material RACNT-BSA e a proteína CAT. Portanto, foram avaliadas a exclusão de proteínas (CAT), a atividade enzimática da CAT antes e após o contato com o material e a produção de apoproteínas.

##### **5.4.1 Avaliação da exclusão de proteínas CAT pelos RACNT-BSA em função do pH**

Segundo o método de Bradford, foram determinadas a concentração das frações dos percolados proteicos da CAT entre os valores de pH 3,5 a 8,5 (MARION, 1976). Os valores de absorbâncias foram medidos no comprimento de onda de 595 nm. Entre os fatores que afetam a preservação das funções biológicas das proteínas, o valor de pH é de extrema importância, pois a sua estrutura conformacional sofre modificações e consequentemente as interações com os CNT podem ser estudadas mais detalhadamente (DAVID L. NELSON, 2014).

De acordo com os resultados da Figura 33, foi possível avaliar a influência do pH na exclusão da proteína de catalase nos RACNT-BSA, sendo que essa característica é de extrema importância na aplicação desse material para atuar como um material de acesso restrito. Isto é, ao aplicar esse material em meios biológicos, este pode excluir macromoléculas como proteínas e atrair somente o analito que se deseja determinar, neste caso o íon Fe (III).

Figura 33 - Efeito do pH na exclusão de catalase do RACNT-BSA.



FONTE: Do autor.

NOTA: Prepararam-se soluções de CAT ( $3 \text{ mg mL}^{-1}$ ) no intervalo de pH 3,5 a 8,5. As soluções foram preparadas em tampões adequados para cada pH com concentração de 10 mM. Percolaram-se as soluções em cartuchos de SPE preenchidos com 5 mg de RACNT-BSA e assim determinaram-se as concentrações de CAT antes e depois da percolação.

Para os intervalos de valores de pH  $< 4,5$  e pH  $> 6,0$  obtiveram-se altas porcentagens de recuperação da CAT (acima de 80 e 90%). Segundo (EDRI; REGEV, 2008), o valor de pH pode influenciar na conformação das proteínas, portanto para esse resultado, em pH mais baixo, a estrutura conformacional da molécula da CAT pode estar em uma conformação que não favorece atração ao RACNT-BSA ou pode estar relacionado com a carga superficial, pois, neste intervalo, a molécula de CAT se encontra carregada positivamente. Sendo assim, considerou-se que houve uma maior repulsão eletrostática entre as moléculas de CAT e o RACNT-BSA e o mesmo ocorre em pH acima de 6,0, porém os mesmos estão carregados negativamente (EDRI; REGEV, 2008).

No intervalo de pH entre 5,0 e 6,5, houve uma mudança no comportamento de adsorção da CAT nos RACNT-BSA, mostrando uma maior interação entre os mesmos, isto é, uma recuperação de proteínas dos percolados de 68,85 a 75,90%. É importante mencionar que mesmo alterando o pH, há processo de exclusão, o que corrobora com a hipótese de que a exclusão também ocorre pela influência da barreira física, o qual é caracterizada pelo pequeno tamanho dos poros do adsorvente, pois apenas pequenas

moléculas são capazes de acessar o interior dos mesmos e o impedimento das macromoléculas (DE FARIA *et al.*, 2017; DESILETS; ROUNDS; REGNIER, 1991).

É importante salientar que este intervalo de valores de pH compreende o valor de pI da CAT, descrito na literatura (5,4) (SAMEJIMA; KAMATA; SHIBATA, 1962) e experimentalmente 5,54.

As regiões próximas ao pI da CAT é muito instável, pois as quantidades de cargas positivas são teoricamente iguais às de cargas negativas. Como representado os pI dos materiais na Figura 34, o RACNT-BSA está carregado negativamente acima de seu pI (3,46) e a CAT positivamente abaixo do pI (5,54) e conseqüentemente, nessa região podem prevalecer as forças de interações eletrostáticas atrativas entre os mesmos.

Esta faixa de pH corrobora com a literatura em relação à solubilidade das proteínas, pois, quando uma solução proteica está no seu pI ou próximo (quando a proteína num sistema aquoso apresenta carga líquida nula), as interações CAT-CAT aumentam. Portanto, as forças eletrostáticas moleculares estão minimizadas e conseqüentemente, menos moléculas de água interagem com as moléculas de CAT. Esta condição é favorável para que as moléculas de proteína se aproximem, agreguem e precipitem. Assim, quanto mais próximo for o pH de uma solução proteica do seu pI, mais baixa será a solubilidade da mesma (KAKALIS; REGENSTEIN, 1986; PELEGRINE; GASPARETTO, 2005).

Figura 34 - Quadro representativo dos pontos isoelétricos dos materiais estudados.

pH	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0
CNT	3,17							
CNT ox.	2,65							
RACNT-BSA	3,46							
BSA int.	4,37							
BSA p.	4,95							
CAT	5,54							
	Carga positiva			pI		Carga negativa		

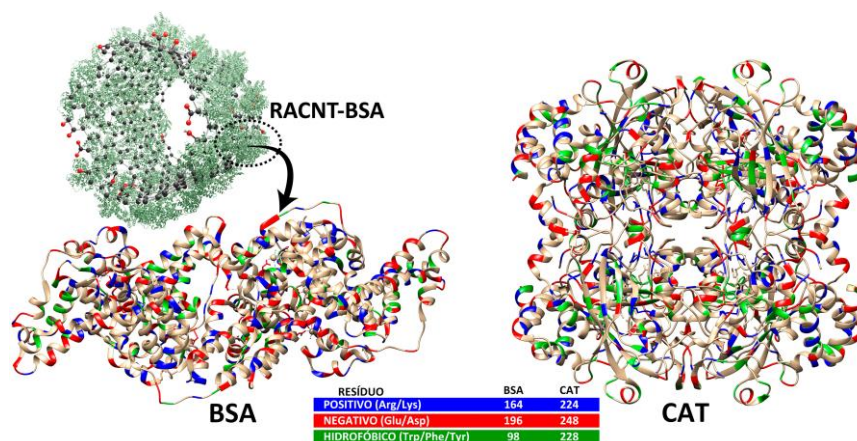
FONTE: Do autor.

NOTA: Os valores de pI representados no quadro foram determinados pela técnica de PZ no item 4.4.5.

De acordo com os dados experimentais, a BSA e a CAT possuem pI de 4,95 e 5,54, respectivamente. Contudo, o pI fornece informações que podem relacionar as interações atrativas ou repulsivas entre as cargas superficiais do material sintetizado RACNT-BSA e a CAT.

Outra possível maneira de avaliar, as interações eletrostáticas, foi por meio da distribuição de resíduos de aminoácidos das proteínas estudadas e sua característica quanto às cargas, positiva (Arg e Lys) e negativa (Glu e Asp). De acordo com a Figura 35, observou-se que há uma distribuição homogênea. Entretanto, houve um excesso de cargas negativas nas proteínas, favorecendo assim repulsão eletrostática entre a CAT e o RACNT-BSA. Vale ressaltar outras formas de interações, destacando as hidrofóbicas e interações  $\pi$ - $\pi$ , que ocorrem entre os elétrons deslocalizados na superfície do CNT e os resíduos aromáticos (Trp, Phe e Tyr) (MARCHESAN; PRATO, 2015; SINGH *et al.*, 2012).

Figura 35 - Distribuição de resíduos positivos e negativos em BSA e CAT.



FONTE: Do autor.

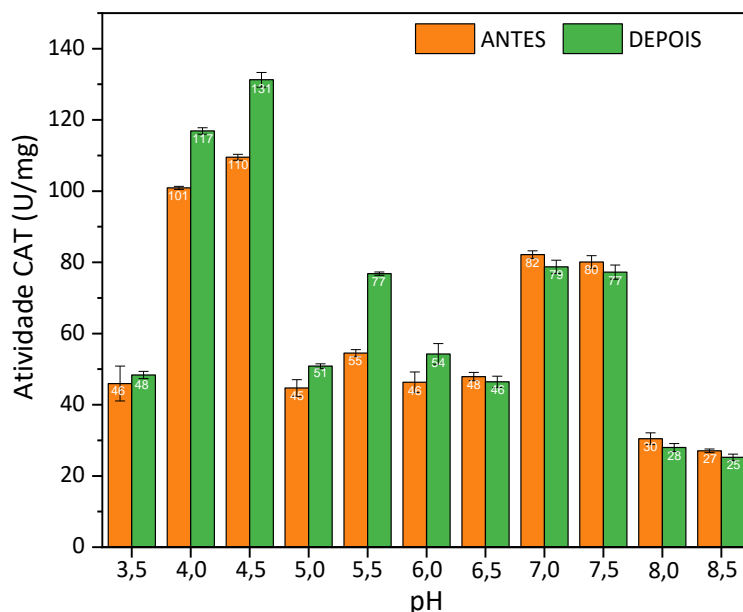
NOTA: Resíduos positivos, negativos e hidrofóbicos estão representados pelas cores azul, vermelho e verde, respectivamente. Para a contagem de resíduos foi utilizado o software Chimera X 1.2.5.

#### 5.4.2 Estudo da atividade da CAT em relação ao pH

Continuando o estudo de interação entre RACNT-BSA e a CAT, neste tópico será discutido a influência do pH na atividade da CAT ( $U\ mL^{-1}$ ) antes e após o contato com os RACNT-BSA. Determinou-se o coeficiente angular do trecho linear de 120 s, referente a reação entre a solução de  $H_2O_2$  e CAT, assim, foi possível calcular a atividade da catalase em cada pH de acordo com a equação 20.

A influência do pH na atividade enzimática da CAT foi estudada nos intervalos de valores de pH 3,5 a 8,5. O resultado quantitativo da atividade enzimática ( $U\ mg^{-1}$ ) está representado na Figura 36.

Figura 36 - Dados de atividade da CAT antes e após da percolação.



FONTE: Do autor.

NOTA: Prepararam-se soluções de CAT ( $3 \text{ mg mL}^{-1}$ ) no intervalo de pH 3,5 a 8,5. As soluções foram preparadas em tampões adequados para cada pH com concentração de 10 mM. Percolaram-se as soluções em cartuchos de SPE preenchidos com 5 mg de RACNT-BSA e assim determinou-se a atividade enzimática da CAT antes e depois da percolação.

Observando o gráfico, o valor de pH de máxima atividade catalítica da CAT para a faixa do experimento, está entre os valores de pH (4,0 e 4,5) e (7,0 - 7,5), ressaltando que na região de pH (7,0 - 7,5) é onde ocorre a maioria das reações biológicas, favorecendo assim, a aplicação desse material. De acordo com a literatura, a medida de atividade de CAT é dificultada em valores de pH  $< 4,0$  e  $> 9,00$  (BARTOSZEK; SUŁKOWSKI, 2006).

A baixa atividade no intervalo de pH (5,0 - 6,5), pode ser justificada pelo fato do pI da catalase (5,54) ser bem próximo do pH estudado, ou seja, quanto mais próximo for o pH de uma solução proteica do seu ponto isoelétrico (pI), mais baixa será a solubilidade da mesma e, portanto, há uma menor quantidade de CAT livre presente em solução.

#### 5.4.3 Extração de Fe da CAT e determinação de Apoproteína

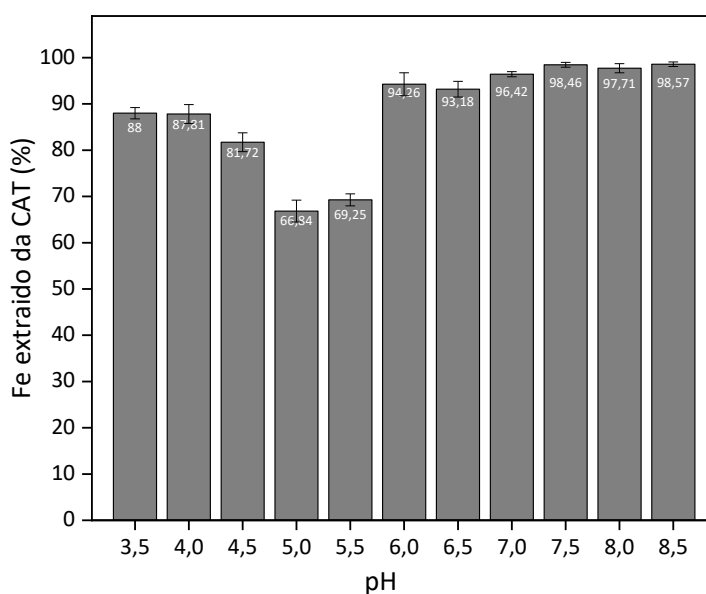
Neste tópico será discutida a viabilidade da produção das apoproteínas a partir da catalase. Como detalhado na revisão da literatura, uma molécula de CAT possui quatro

átomos de Fe complexados em sua estrutura. Assim, após a remoção dos íons Fe, a proteína pode ser considerada uma apoproteína.

Com o intuito da extração do Fe presente na CAT, inicialmente foram preparadas separadamente soluções de CAT,  $3 \text{ mg mL}^{-1}$  no intervalo de pH 3,5 a 8,5 nos tampões acetato, fosfato e TRIS-HCl com concentração de 10 mM.

De acordo com a literatura, a concentração aproximada de Fe presente em uma solução de CAT  $3 \text{ mg L}^{-1}$  é na ordem de 1000 vezes menor, portanto a concentração de Fe seria de  $3 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ , conseqüentemente, seria impossível determinar essa concentração pelo método de FAAS. Portanto, trabalhamos com concentrações de catalase de  $3 \text{ mg mL}^{-1}$ , conseqüentemente o Fe estará na ordem de  $3 \text{ mg L}^{-1}$  (3 ppm), sendo possível sua quantificação por FAAS. Na figura 37 estão representados os percentuais de ferro extraído da CAT para cada pH.

Figura 37 - Percentual de íons Fe extraídos da CAT.

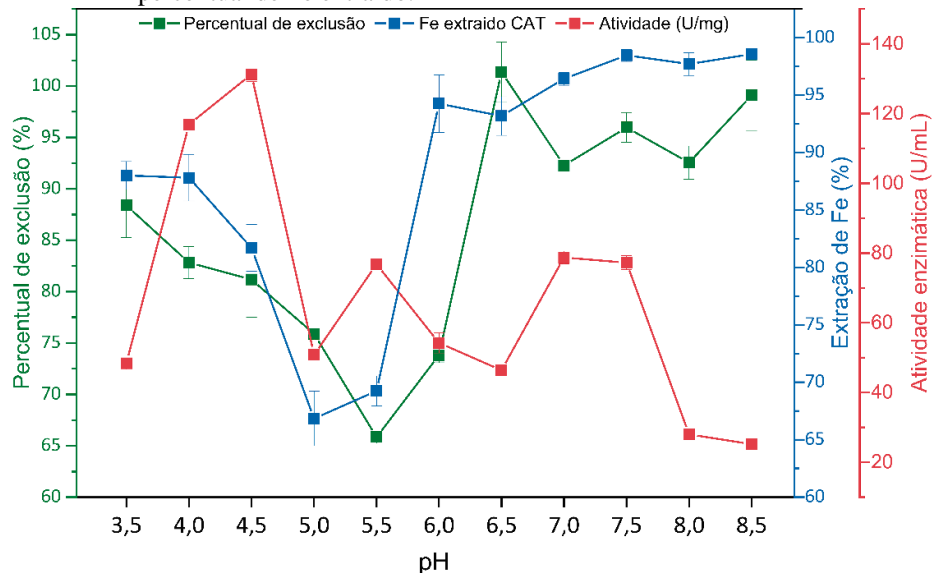


FONTE: Do autor.

NOTA: Preparou-se soluções de CAT ( $3 \text{ mg mL}^{-1}$ ) no intervalo de pH 3,5 a 8,5. As soluções foram preparadas em tampões adequados para cada pH com concentração de 10  $\mu\text{M}$ . Percolou-se as soluções em cartuchos de SPE preenchidos com 5 mg de RACNT-BSA e assim determinou-se a concentração de íons Fe (III) antes e depois da percolação.

Foram avaliados a relação entre os três parâmetros, estudos de exclusão proteica, atividade enzimática da CAT e extração de ferro da CAT, que são apresentados em um gráfico (Figura 38), para fins de comparação.

Figura 38 - Relação dos parâmetros percentual de exclusão, atividade enzimática e percentual de Fe extraído.



FONTE: Do autor.

Observando a figura 38, os resultados experimentais de extração de Fe, da da CAT, estão de acordo com os resultados de exclusão, pois confirmam simultaneamente a exclusão de macromoléculas como proteínas e a extração metais. Portanto, com esse estudo, os RACNT-BSA podem ser aplicados na extração e pré concentração de íons Fe (III) e outros metais em matrizes complexas e para a produção de apoproteínas.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os mecanismos envolvidos entre os três materiais, CNT, CNTox e RACNT-BSA, com íons ferro em solução, foram baseadas nas interações físicas (fisissorção) como interações eletrostáticas e adsorção física e quimissorção como troca iônica e complexação superficial. O modelo cinético fracionário de Avrami foi o que melhor se ajustou aos dados experimentais.

Uma menor capacidade de adsorção, de Fe, foi observada para os RACNT-BSA, provavelmente como consequência da camada externa de BSA que obstrui o acesso do metal aos grupos funcionais oxigenados na superfície dos CNT.

De acordo com os estudos termodinâmicos, os RACNT-BSA apresentaram a menor energia de Gibbs, o que pode indicar a prevalência da fisissorção em comparação com a quimissorção. Por outro lado, os CNT e CNTox apresentaram maiores energias de Gibbs, em que prevalecem os mecanismos duplos baseados na fisissorção e quimissorção.

O RACNT-BSA, devido à camada externa de BSA, possui elevada capacidade de excluir proteínas em matrizes complexas, como já relatado e bastante consolidado na literatura. Ressalta-se que a sensibilidade e seletividade precisam ser avaliadas em cada aplicação, mas, de forma geral, o desempenho do RACNT-BSA tem sido mais vantajoso na aplicação em fluidos biológicos sem tratamento prévio.

Também pode ser aplicado na separação/purificação de enzimas, e extração de metais a partir de metaloproteínas (apoproteínas), pois as estratégias de agentes quelantes para a remoção de metais por diálise e cromatografia de coluna por troca iônica são técnicas demoradas e de elevado custo.

Portanto, de acordo com o estudo da interação do RACNT-BSA com a catalase, este material consiste em uma alternativa para a produção de apoproteínas, pois o mesmo se mostrou eficiente na remoção do ferro e a preservação da atividade enzimática após exclusão proteica.

Os materiais CNT e CNTox apresentaram maior capacidade de adsorção de ferro, em relação ao RACNT-BSA, em meio aquoso, sendo muito úteis em processos de adsorção em amostras aquosas e não proteicas.

## REFERÊNCIAS

- ACOSTA, M. *et al.* On-line solid phase extraction of Cd from protein fractions of serum using oxidized carbon nanotubes coupled to electrothermal atomization atomic absorption spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 110, p. 94–98, 2013.
- ADAMSON, A. W.; GAST, A. P. **Physical chemistry of surfaces**. 6th. ed. New York: Wiley, 1997.
- AFZALI, D. *et al.* Application of modified multiwalled carbon nanotubes as solid sorbent for separation and preconcentration of trace amounts of manganese ions. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 5, n. 2, p. 187–191, 2012.
- ALIMOHAMMADY, M. *et al.* A new modified MWCNTs with 3-aminopyrazole as a nanoadsorbent for Cd (II) removal from aqueous solutions. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 5, n. 4, p. 3405–3417, 2017.
- ALIMOHAMMADY, M. *et al.* Design and evaluation of functionalized multi-walled carbon nanotubes by 3-aminopyrazole for the removal of Hg (II) and As (III) ions from aqueous solution. **Research on Chemical Intermediates**, v. 44, n. 1, p. 69–92, 2018.
- ALIMOHAMMADY, M. *et al.* Competent Heavy Metal Adsorption by Modified MWCNTs and Optimization Process by Experimental Design. **J. Environ. Eng.**, v. 144, n. 11, p. 16, 2018.
- ALKAN, M. *et al.* Surface properties of bovine serum albumin – adsorbed oxides: Adsorption, adsorption kinetics and electrokinetic properties. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 96, n. 1–3, p. 331–340, 2006.
- ALQADAMI, A. *et al.* Application of Solid Phase Extraction on Multiwalled Carbon Nanotubes of Some Heavy Metal Ions to Analysis of Skin Whitening Cosmetics Using ICP-AES. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 10, n. 1, p. 361–374, 2013.
- ALVES, M. D. *et al.* Isotherm, kinetic, mechanism and thermodynamic studies of adsorption of a microbial lipase on a mesoporous and hydrophobic resin. **Chemical Engineering Journal**, v. 311, p. 1–12, 2017.
- ANJUM, H. *et al.* A review on adsorptive removal of oil pollutants (BTEX) from wastewater using carbon nanotubes. **Journal of Molecular Liquids**, v. 277, p. 1005–1025, 2019.
- ANON, S. A.; MOSADDEGHI, H.; GHAYEB, Y. Molecular Dynamics Study of the Interaction Between RNA-Binding Domain of NS1 Influenza A Virus and Various Types of Carbon Nanotubes. **Current Science**, v. 116, n. 3, p. 398, 2019.
- ATKINS, P. *et al.* **Inorganic chemistry**. 5th. ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2010.

AVANTI, C. *et al.* A New Strategy to Stabilize Oxytocin in Aqueous Solutions: I. The Effects of Divalent Metal Ions and Citrate Buffer. **The AAPS Journal**, v. 13, n. 2, p. 284–290, 2011.

AVILÉS, F. *et al.* Evaluation of mild acid oxidation treatments for MWCNT functionalization. **Carbon**, v. 47, n. 13, p. 2970–2975, 2009.

AYERS, P. W.; PARR, R. G.; PEARSON, R. G. Elucidating the hard/soft acid/base principle: A perspective based on half-reactions. **The Journal of Chemical Physics**, v. 124, n. 19, p. 194107, 2006.

BABARINDE, A. *et al.* Biosorption of Ni (II), Cr (III), and Co (II) from Solutions Using *Acalypha hispida* Leaf: Kinetics, Equilibrium, and Thermodynamics. **Journal of Chemistry**, v. 2013, p. 1–8, 2013.

BALDUINO, J. S. *et al.* Magnetic restricted access carbon nanotubes for smooth Cu and Zn extraction from Cu, Zn-superoxide dismutase. **SN Applied Sciences**, v. 1, n. 10, p. 1246, 2019.

BANDARU, N. M. *et al.* Enhanced adsorption of mercury ions on thiol derivatized single wall carbon nanotubes. **Journal of Hazardous Materials**, v. 261, p. 534–541, 2013.

BANERJEE, S.; HEMRAJ-BENNY, T.; WONG, S. S. Covalent Surface Chemistry of Single-Walled Carbon Nanotubes. **Advanced Materials**, v. 17, n. 1, p. 17–29, 2005.

BANSAL, R. C.; GOYAL, M. **Activated carbon adsorption**. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2005.

BARBARINO, M.; GIORDANO, A. Assessment of the Carcinogenicity of Carbon Nanotubes in the Respiratory System. **Cancers**, v. 13, n. 6, p. 1318, 2021.

BARBOSA, A. F. *et al.* Restricted access carbon nanotubes for direct extraction of cadmium from human serum samples followed by atomic absorption spectrometry analysis. **Talanta**, v. 131, p. 213–220, 2015.

BARBOSA, V. M. P. *et al.* Direct extraction of lead (II) from untreated human blood serum using restricted access carbon nanotubes and its determination by atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 147, p. 478–484, 2016.

BARREIRO, J. C. *et al.* A column-switching method for quantification of the enantiomers of omeprazole in native matrices of waste and estuarine water samples. **Talanta**, v. 82, n. 1, p. 384–391, 2010.

BARTH, A. Infrared spectroscopy of proteins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1767, n. 9, p. 1073–1101, 2007.

BARTOSZEK, M.; SUŁKOWSKI, W. W. The study of pH influence on bovine liver catalase by means of UV-VIS spectroscopy and spin labelling method. **POLISH JOURNAL OF ENVIRONMENT STUDIES**, p. 41, 2006.

BASSYOUNI, M. *et al.* Utilization of carbon nanotubes in removal of heavy metals from wastewater: a review of the CNTs' potential and current challenges. **Applied Physics A**, v. 126, n. 1, p. 38, 2020.

BAYAZIT, Ş. S.; KERKEZ, Ö. Hexavalent chromium adsorption on superparamagnetic multi-wall carbon nanotubes and activated carbon composites. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 92, n. 11, p. 2725–2733, 2014.

BELIN, T.; EPRON, F. Characterization methods of carbon nanotubes: a review. **Materials Science and Engineering: B**, v. 119, n. 2, p. 105–118, 2005.

BORJI, H. *et al.* How Effective Are Nanomaterials for the Removal of Heavy Metals from Water and Wastewater? **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 231, n. 7, p. 330, 2020.

CABALLERO-CASERO, N. *et al.* Nanostructured alkyl carboxylic acid-based restricted access solvents: Application to the combined microextraction and cleanup of polycyclic aromatic hydrocarbons in mosses. **Analytica Chimica Acta**, v. 890, p. 124–133, 2015.

CAMPOS DO LAGO, A. *et al.* Magnetic restricted-access carbon nanotubes for dispersive solid phase extraction of organophosphates pesticides from bovine milk samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 1102, p. 11–23, 2020.

CHADAR, R. *et al.* Carbon nanotubes as an emerging nanocarrier for the delivery of doxorubicin for improved chemotherapy. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 208, p. 112044, 2021.

CHATTERJEE, A.; ABRAHAM, J. Desorption of heavy metals from metal loaded sorbents and e-wastes: A review. **Biotechnology Letters**, v. 41, n. 3, p. 319–333, 2019.

CHI, Z. *et al.* Investigation on the conformational changes of bovine serum albumin in a wide pH range from 2 to 12. **Spectroscopy Letters**, v. 51, n. 6, p. 279–286, 2018.

CHIAP, P. *et al.* Use of a novel cation-exchange restricted-access material for automated sample clean-up prior to the determination of basic drugs in plasma by liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 975, n. 1, p. 145–155, 2002.

CHICO, J. *et al.* Restricted access materials for sample clean-up in the analysis of trace levels of tetracyclines by liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1181, n. 1–2, p. 1–8, 2008.

CHOW, E.; GOODING, J. J. Peptide Modified Electrodes as Electrochemical Metal Ion Sensors. **Electroanalysis**, v. 18, n. 15, p. 1437–1448, 2006.

COSTA, H. H. V. *et al.* Preconcentration/Cleanup Studies of Tin from Environmental Water Samples by Oxidized Multiwall Carbon Nanotubes Packed Column and its Determination by ETAAS. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 217, n. 1–4, p. 557–565, 2011.

CRICHTON, R. R. **Biological inorganic chemistry: a new introduction to molecular structure and function**. 3rd ed. London San Diego, CA: Academic press, an imprint of Elsevier, 2019.

CRUZ, J. C. *et al.* Restricted access carbon nanotube for microextraction by packed sorbent to determine antipsychotics in plasma samples by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 412, n. 11, p. 2465–2475, 2020.

CSIRE, G. *et al.* Complex formation processes and metal ion catalyzed oxidation of model peptides related to the metal binding site of the human prion protein. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 203, p. 110927, 2020.

CURRY, S.; BRICK, P.; FRANKS, N. P. Fatty acid binding to human serum albumin: new insights from crystallographic studies. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1441, n. 2–3, p. 131–140, 1999.

DAVID L. NELSON, M. M. C. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

DE FARIA, H. D. *et al.* New advances in restricted access materials for sample preparation: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 959, p. 43–65, 2017.

DE FARIA, H. D. *et al.* Online extraction of antihypertensive drugs and their metabolites from untreated human serum samples using restricted access carbon nanotubes in a column switching liquid chromatography system. **Journal of Chromatography A**, v. 1528, p. 41–52, 2017.

DE FARIA, H. D. *et al.* Direct extraction of tetracyclines from bovine milk using restricted access carbon nanotubes in a column switching liquid chromatography system. **Food Chemistry**, v. 225, p. 98–106, 2017.

DE OLIVEIRA, F. F. *et al.* Reactive Adsorption of Parabens on Synthesized Micro- and Mesoporous Silica from Coal Fly Ash: pH Effect on the Modification Process. **ACS Omega**, v. 5, n. 7, p. 3346–3357, 2020.

DE PAULA, F. C. C. R.; DE PIETRO, A. C.; CASS, Q. B. Simultaneous quantification of sulfamethoxazole and trimethoprim in whole egg samples by column-switching high-performance liquid chromatography using restricted access media column for on-line sample clean-up. **Journal of Chromatography A**, v. 1189, n. 1–2, p. 221–226, 2008.

DESILETS, C. P.; ROUNDS, M. A.; REGNIER, F. E. Semipermeable-surface reversed-phase media for high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 544, p. 25–39, 1991.

DÍAZ-BLANCAS, V. *et al.* 3D modeling of the overall adsorption rate of metronidazole on granular activated carbon at low and high concentrations in aqueous solution. **Chemical Engineering Journal**, v. 349, p. 82–91, 2018.

DOS SANTOS, R. C. *et al.* Characterization and application of restricted access carbon nanotubes in online extraction of anticonvulsant drugs from plasma samples followed by liquid chromatography analysis. **Journal of Chromatography B**, v. 1054, p. 50–56, 2017.

- DRESSELHAUS, M. S.; JORIO, A.; SAITO, R. Characterizing Graphene, Graphite, and Carbon Nanotubes by Raman Spectroscopy. **Annual Review of Condensed Matter Physics**, v. 1, n. 1, p. 89–108, 2010.
- DUAN, C. *et al.* Removal of heavy metals from aqueous solution using carbon-based adsorbents: A review. **Journal of Water Process Engineering**, v. 37, p. 101339, 2020.
- EBRAHIMZADEH, H. *et al.* Novel ion imprinted polymer coated multiwalled carbon nanotubes as a high selective sorbent for determination of gold ions in environmental samples. **Chemical Engineering Journal**, v. 215–216, p. 315–321, 2013.
- ECKERT, E. *et al.* A method for the simultaneous determination of mercapturic acids as biomarkers of exposure to 2-chloroprene and epichlorohydrin in human urine. **Journal of Chromatography B**, v. 889–890, p. 69–76, 2012.
- ECKERT, E.; GÖEN, T. Rapid determination of four short-chain alkyl mercapturic acids in human urine by column-switching liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 965, p. 54–60, 2014.
- EDRI, E.; REGEV, O. pH Effects On BSA-Dispersed Carbon Nanotubes Studied by Spectroscopy-Enhanced Composition Evaluation Techniques. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 11, p. 4049–4054, 2008.
- EGBOSIUBA, T. C. *et al.* Taguchi optimization design of diameter-controlled synthesis of multi walled carbon nanotubes for the adsorption of Pb (II) and Ni (II) from chemical industry wastewater. **Chemosphere**, v. 266, p. 128937, 2021.
- EL-SHEIKH, A. H. *et al.* Effect of oxidation and geometrical dimensions of carbon nanotubes on Hg (II) sorption and preconcentration from real waters. **Desalination**, v. 270, n. 1–3, p. 214–220, 2011.
- EL-SHEIKH, A. H. *et al.* Separation and flame atomic absorption spectrometric determination of total chromium and chromium (III) in phosphate rock used for production of fertilizer. **Talanta**, v. 116, p. 482–487, 2013.
- ENAYATPOUR, B. *et al.* Adsorption kinetics of lysozyme on multi-walled carbon nanotubes and amino functionalized multi-walled carbon nanotubes from aqueous solution. **Journal of Molecular Liquids**, v. 254, p. 93–97, 2018.
- FARGHALI, A. A. *et al.* Functionalization of acidified multi-walled carbon nanotubes for removal of heavy metals in aqueous solutions. **Journal of Nanostructure in Chemistry**, v. 7, n. 2, p. 101–111, 2017.
- FENG, J. *et al.* Hollow fiber membrane-coated functionalized polymeric ionic liquid capsules for direct analysis of estrogens in milk samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 408, n. 6, p. 1679–1685, 2016.
- FIYADH, S. S. *et al.* Review on heavy metal adsorption processes by carbon nanotubes. **Journal of Cleaner Production**, v. 230, p. 783–793, 2019.

FLAHAUT, E.; LAURENT, CH.; PEIGNEY, A. Catalytic CVD synthesis of double and triple-walled carbon nanotubes by the control of the catalyst preparation. **Carbon**, v. 43, n. 2, p. 375–383, 2005.

FORRÓ, L.; SCHÖNENBERGER, C. Physical Properties of Multi-wall Nanotubes. Em: DRESSELHAUS, M. S.; DRESSELHAUS, G.; AVOURIS, P. (Eds.). **Carbon Nanotubes**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2001. v. 80p. 329–391.

FRÖHLICH, A. C. *et al.* Three-dimensional mass transfer modeling of ibuprofen adsorption on activated carbon prepared by sonication. **Chemical Engineering Journal**, v. 341, p. 65–74, 2018.

FRUGERI, P. M. *et al.* Magnetic restricted-access carbon nanotubes for the extraction/pre-concentration of organophosphates from food samples followed by spectrophotometric determination. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 241, p. 118632, 2020.

FU, F.; WANG, Q. Removal of heavy metal ions from wastewaters: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 92, n. 3, p. 407–418, 2011.

FUMES, B. H. *et al.* Recent advances and future trends in new materials for sample preparation. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 9–25, 2015.

GAY, D. S. F. *et al.* Silica grafted with a silsesquioxane containing the positively charged 1,4-diazoniabicyclo [2.2.2]octane group used as adsorbent for anionic dye removal. **Desalination**, v. 258, n. 1–3, p. 128–135, 2010.

GOMES, R. A. B. *et al.* Evaluation of the pH influence on protein exclusion by restricted access carbon nanotubes coated with bovine serum albumin. **Journal of Materials Science**, v. 51, n. 16, p. 7407–7414, 2016.

GONZÁLEZ-SÁLAMO, J. *et al.* Nanomaterials as sorbents for food sample analysis. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 85, p. 203–220, 2016.

GUPTA, V. K. *et al.* Study on the removal of heavy metal ions from industry waste by carbon nanotubes: Effect of the surface modification: a review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 46, n. 2, p. 93–118, 17 2016.

HAGINAKA, J.; WAKAI, J. Preparation and characterization of mixed functional phase silica materials using phenyl-, butyl- or octylchlorosilane as a silylating agent. **Journal of Chromatography A**, v. 596, n. 2, p. 151–156, 1992.

HAGINAKA, J.; WAKAI, J.; YASUDA, H. Synthesis of mixed-functional-phase silica supports for liquid chromatography and their applications to assays of drugs in serum. **Journal of Chromatography A**, v. 535, p. 163–172, 1990.

HAN, X.-L. *et al.* Spectroscopic, structural and thermodynamic properties of chlorpyrifos bound to serum albumin: A comparative study between BSA and HSA. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 109, p. 1–11, 2012.

HAYATI, B. *et al.* Synthesis and characterization of PAMAM/CNT nanocomposite as a super-capacity adsorbent for heavy metal ( $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{As}^{3+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ) removal from wastewater. **Journal of Molecular Liquids**, v. 224, p. 1032–1040, 2016.

HE, X. M.; CARTER, D. C. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. **Nature**, v. 358, n. 6383, p. 209–215, 1992.

HERRERO-LATORRE, C. *et al.* Graphene and carbon nanotubes as solid phase extraction sorbents for the speciation of chromium: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 1002, p. 1–17, 2018.

HO, Y. S.; MCKAY, G. Pseudo-second order model for sorption processes. **Process Biochemistry**, v. 34, n. 5, p. 451–465, 1999.

HOANG, A. T. *et al.* Heavy metal removal by biomass-derived carbon nanotubes as a greener environmental remediation: A comprehensive review. **Chemosphere**, v. 287, p. 131959, 2022.

HOSSINI, H. *et al.* Equilibrium and kinetic studies of chromium adsorption from wastewater by functionalized multi-wall carbon nanotubes. **Reaction Kinetics, Mechanisms and Catalysis**, v. 112, n. 2, p. 371–382, 2014.

HOU, P.-X.; LIU, C.; CHENG, H.-M. Purification of carbon nanotubes. **Carbon**, v. 46, n. 15, p. 2003–2025, 2008.

HOUSECROFT, C. **Inorganic Chemistry**. 4 th. ed. Englang: Pearson, 2012.

IHSANULLAH *et al.* Adsorptive removal of cadmium (II) ions from liquid phase using acid modified carbon-based adsorbents. **Journal of Molecular Liquids**, v. 204, p. 255–263, 2015.

IHSANULLAH *et al.* Heavy metal removal from aqueous solution by advanced carbon nanotubes: Critical review of adsorption applications. **Separation and Purification Technology**, v. 157, p. 141–161, 2016.

IHSANULLAH *et al.* Effect of acid modification on adsorption of hexavalent chromium (Cr (VI)) from aqueous solution by activated carbon and carbon nanotubes. **Desalination and Water Treatment**, v. 57, n. 16, p. 7232–7244, 2 abr. 2016.

IJJIMA, S. Helical microtubules of graphitic carbon. **Nature**, v. 354, n. 6348, p. 56–58, 1991.

IJJIMA, S.; ICHIHASHI, T. Single-shell carbon nanotubes of 1-nm diameter. **Letters to nature**, v. 363, 1993.

INYANG, H. I.; ONWAWOMA, A.; BAE, S. The Elovich equation as a predictor of lead and cadmium sorption rates on contaminant barrier minerals. **Soil and Tillage Research**, v. 155, p. 124–132, 2016.

ISLAM, A. *et al.* Functionalized carbon nanotubes for dispersive solid-phase extraction and atomic absorption spectroscopic determination of toxic metals ions. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 16, n. 2, p. 707–718, 2019.

- JAMPILEK, J.; KRALOVA, K. Advances in Drug Delivery Nanosystems Using Graphene-Based Materials and Carbon Nanotubes. **Materials**, v. 14, n. 5, p. 1059, 2021.
- JEONG, S. *et al.* Extraction of Viral Nucleic Acids with Carbon Nanotubes Increases SARS-CoV-2 Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Detection Sensitivity. **ACS Nano**, v. 15, n. 6, p. 10309–10317, 2021.
- JR, T. P. **All About Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications**. [s.l.]: Academic Press, 1995.
- KAIM, W.; SCHWEDERSKI, B.; KLEIN, A. **Bioinorganic Chemistry: Inorganic elements in the chemistry of life**. 2nd ed. England: John Wiley & Sons, Ltd, 2013.
- KAKALIS, L. T.; REGENSTEIN, J. M. Effect of pH and salts on the solubility of egg white protein. **Journal of Food Science**, v. 51, n. 6, p. 1445–1447, 1986.
- KANTHAPAZHAM, R.; AYYAVU, C.; MAHENDIRADAS, D. Removal of Pb<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup> ions in aqueous media using functionalized MWCNT wrapped polypyrrole nanocomposite. **Desalination and Water Treatment**, p. 1–15, 2015.
- KAWANO, S. *et al.* Analysis of chloramphenicol in honey by on-line pretreatment liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Chinese Chemical Letters**, v. 26, n. 1, p. 36–38, 2015.
- KIM, D. S.; NEPAL, D.; GECKELER, K. E. Individualization of Single-Walled Carbon Nanotubes: Is the Solvent Important? **Small**, v. 1, n. 11, p. 1117–1124, 2005.
- KIM, U. J. *et al.* Raman and IR Spectroscopy of Chemically Processed Single-Walled Carbon Nanotubes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 44, p. 15437–15445, 2005.
- KISHIDA, K. Restricted-access media liquid chromatography for determination of sulfamonomethoxine, sulfadimethoxine, and their N4-acetyl metabolites in eggs. **Food Chemistry**, v. 101, n. 1, p. 281–285, 2007.
- KOLOSNJAJ, J.; SZWARC, H.; MOUSSA, F. Toxicity Studies of Carbon Nanotubes. Em: CHAN, W. C. W. (Ed.). **Bio-Applications of Nanoparticles**. New York, NY: Springer New York, 2007. v. 620p. 181–204.
- KOLOSNJAJ-TABI, J.; SZWARC, H.; MOUSS, F. In vivo Toxicity Studies of Pristine Carbon Nanotubes: A Review. Em: HASHIM, A. A. (Ed.). **The Delivery of Nanoparticles**. [s.l.]: InTech, 2012.
- KOŃCZYK, J.; ŻARSKA, S.; CIESIELSKI, W. Adsorptive removal of Pb (II) ions from aqueous solutions by multi-walled carbon nanotubes functionalised by selenophosphoryl groups: Kinetic, mechanism, and thermodynamic studies. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 575, p. 271–282, 2019.

- KOPAC, T.; BOZGEYIK, K.; YENER, J. Effect of pH and temperature on the adsorption of bovine serum albumin onto titanium dioxide. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 322, n. 1–3, p. 19–28, 2008.
- KRUG, F. J. **Métodos de Preparo de Amostras para Análise Elementar**. 2<sup>a</sup> ed. Brail: EdtSBQ, 2016.
- KUDELSKI, A. Influence of electrostatically bound proteins on the structure of linkage monolayers: adsorption of bovine serum albumin on silver and gold substrates coated with monolayers of 2-mercaptoethanesulphonate. **Vibrational Spectroscopy**, v. 33, n. 1–2, p. 197–204, 2003.
- KUMAR, P. S. *et al.* Adsorption behavior of nickel (II) onto cashew nut shell: Equilibrium, thermodynamics, kinetics, mechanism and process design. **Chemical Engineering Journal**, v. 167, n. 1, p. 122–131, 2011.
- LAMBERT, J.-P. *et al.* Stir bar sorptive extraction based on restricted access material for the direct extraction of caffeine and metabolites in biological fluids. **Journal of Chromatography A**, v. 1075, n. 1–2, p. 43–49, 2005.
- LAVAGNA, L. *et al.* Functionalization as a way to enhance dispersion of carbon nanotubes in matrices: a review. **Materials Today Chemistry**, v. 20, p. 100477, 2021.
- LEHMAN, J. H. *et al.* Evaluating the characteristics of multiwall carbon nanotubes. **Carbon**, v. 49, n. 8, p. 2581–2602, 2011.
- LI, W.; SHI, Y. Recent advances and applications of carbon nanotubes based composites in magnetic solid-phase extraction. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 118, p. 652–665, 2019.
- LIMA, V. V. DE; CASSIANO, N. M.; CASS, Q. B. Desenvolvimento de colunas cromatográficas de meios de acesso restrito proteína-imobilizada e suas avaliações para análise de fármacos com injeção direta de plasma humano. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 72–78, 2006.
- LIPPARD, S. J.; BERG, J. M. **Principles of bioinorganic chemistry**. Califórnia: University Science Books, 1994.
- LIU, X. *et al.* Solid phase extraction using magnetic core mesoporous shell microspheres with C18-modified interior pore-walls for residue analysis of cephalosporins in milk by LC–MS/MS. **Food Chemistry**, v. 150, p. 206–212, 2014.
- LIU, Z. *et al.* Synthesis of multi-walled carbon nanotube–hydroxyapatite composites and its application in the sorption of Co (II) from aqueous solutions. **Journal of Molecular Liquids**, v. 179, p. 46–53, 2013.
- LOPES, E. C. N. *et al.* An alternative Avrami equation to evaluate kinetic parameters of the interaction of Hg (II) with thin chitosan membranes. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 263, n. 2, p. 542–547, 2003.

LOU, K. *et al.* Comprehensive studies on the nature of interaction between carboxylated multi-walled carbon nanotubes and bovine serum albumin. **Chemico-Biological Interactions**, v. 243, p. 54–61, 2016.

LU, N. *et al.* Adsorption of human serum albumin on functionalized single-walled carbon nanotubes reduced cytotoxicity. **Chemico-Biological Interactions**, v. 295, p. 64–72, 2018.

MACHTEJEVAS, E. *et al.* Monolithic silica columns of various format in automated sample clean-up/multidimensional liquid chromatography/mass spectrometry for peptidomics. **Journal of Chromatography A**, v. 1144, n. 1, p. 97–101, 2007.

MARCHESAN, S.; PRATO, M. Under the lens: carbon nanotube and protein interaction at the nanoscale. **Chemical Communications**, v. 51, n. 21, p. 4347–4359, 2015.

MARION, MB. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248–254, 1976.

MATEOS, R. *et al.* Graphene/sepiolite mixtures as dispersive solid-phase extraction sorbents for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in wastewater using surfactant aqueous solutions for desorption. **Journal of Chromatography A**, v. 1596, p. 30–40, 2019.

MCCLELLAN, S. J.; FRANCES, E. I. Effect of concentration and denaturation on adsorption and surface tension of bovine serum albumin. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 28, n. 1, p. 63–75, 2003.

MENDES, T.; ROSA, M.; FIGUEIREDO, E. Restricted Access Molecularly Imprinted Polymers for Biological Sample Preparation. **Brazilian Journal of Analytical Chemistry**, v. 9, n. 35, 2021.

MESQUITA, J. P. DE; MARTELLI, P. B.; GORGULHO, H. DE F. Characterization of copper adsorption on oxidized activated carbon. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 6, p. 1133–1143, 2006.

MOOSA, A. A.; RIDHA, A. M.; HUSSIEN, N. A. Removal of Zinc Ions from Aqueous Solution by Bioadsorbents and CNTs. **American Journal of Materials Science**, v. 6, n. 4, p. 105–114, 2016.

MULLETT, W. M. *et al.* Bio-compatible in-tube solid-phase microextraction capillary for the direct extraction and high-performance liquid chromatographic determination of drugs in human serum. **Journal of Chromatography A**, v. 963, n. 1–2, p. 325–334, 2002.

MULLETT, W. M. Determination of drugs in biological fluids by direct injection of samples for liquid-chromatographic analysis. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 70, n. 2, p. 263–273, 2007.

NAVARRETE, A. *et al.* Copper excess detoxification is mediated by a coordinated and complementary induction of glutathione, phytochelatin and metallothioneins in the

green seaweed *Ulva compressa*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 135, p. 423–431, 2019.

NAVEENRAJ, S.; ANANDAN, S. Binding of serum albumins with bioactive substances – Nanoparticles to drugs. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, v. 14, p. 53–71, 2013.

NAZARIO, C. E. D. *et al.* New materials for sample preparation techniques in bioanalysis. **Journal of Chromatography B**, v. 1043, p. 81–95, 2017.

NELSON, D. L.; COX, M. M.; HOSKINS, A. A. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 7th. ed. New York: Macmillan Learning, 2021.

NELSON, D. P.; KIESOW, L. A. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25°C (with molar extinction coefficients of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solutions in the UV). **Analytical Biochemistry**, p. 474–478, 1972.

NICHOLLS, P. Classical catalase: Ancient and modern. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 525, n. 2, p. 95–101, 2012.

OBAYOMI, K. S. *et al.* Statistical analyses on effective removal of cadmium and hexavalent chromium ions by multiwall carbon nanotubes (MWCNTs). **Heliyon**, v. 6, n. 6, p. e04174, 2020.

OUNI, L. *et al.* Isocyanate functionalized multiwalled carbon nanotubes for separation of lead from cyclotron production of thallium-201. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 310, n. 2, p. 633–643, 2016.

OUNI, L.; RAMAZANI, A.; TAGHAVI FARDOOD, S. An overview of carbon nanotubes role in heavy metals removal from wastewater. **Frontiers of Chemical Science and Engineering**, v. 13, n. 2, p. 274–295, 2019.

PADILHA, G. S. *et al.* Multi-walled carbon nanotubes used as support for lipase from *Burkholderia cepacia*: Morphological and physicochemical properties. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 134, n. 2, p. 1021–1029, 2018.

PARK, W. K. *et al.* Feasible water flow filter with facilely functionalized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-non-oxidative graphene/CNT composites for arsenic removal. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 4, n. 3, p. 3246–3252, 2016.

PATOLE, S. P. *et al.* Optimization of water assisted chemical vapor deposition parameters for super growth of carbon nanotubes. **Carbon**, v. 46, n. 14, p. 1987–1993, 2008.

PELEGRINE, D. H. G.; GASPARETTO, C. A. Whey proteins solubility as function of temperature and pH. **LWT - Food Science and Technology**, v. 38, n. 1, p. 77–80, 2005.

PERRY, J. A. *et al.* An Improved Internal Surface Reversed Phase. **Journal of Liquid Chromatography**, v. 15, n. 18, p. 3343–3352, 1992.

PETROVIC, M.; TAVAZZI, S.; BARCELO, D. Column-switching system with restricted access pre-column packing for an integrated sample cleanup and liquid chromatographic–mass spectrometric analysis of alkylphenolic compounds and steroid sex hormones in sediment. **Journal of Chromatography A**, v. 971, n. 1–2, p. 37–45, 2002.

PILLAY, K.; CUKROWSKA, E. M.; COVILLE, N. J. Multi-walled carbon nanotubes as adsorbents for the removal of parts per billion levels of hexavalent chromium from aqueous solution. **Journal of Hazardous Materials**, v. 166, n. 2–3, p. 1067–1075, 2009.

PLAZINSKI, W.; RUDZINSKI, W.; PLAZINSKA, A. Theoretical models of sorption kinetics including a surface reaction mechanism: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 152, n. 1–2, p. 2–13, 2009.

PONTREMOLI, C. *et al.* Insight into the interaction of inhaled corticosteroids with human serum albumin: A spectroscopic-based study. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 8, n. 1, p. 37–44, 2018.

POURREZA, N.; SHEIKHNAJDI, K. Multi-walled carbon nanotube modified with 1-butyl 3-methyl imidazolium hexafluoro phosphate supported on sawdust as a selective adsorbent for solid phase extraction of Bi (III). **Talanta**, v. 99, p. 507–511, 2012.

PYRZYŃSKA, K.; BYSTRZEJEWSKI, M. Comparative study of heavy metal ions sorption onto activated carbon, carbon nanotubes, and carbon-encapsulated magnetic nanoparticles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 362, n. 1–3, p. 102–109, 2010.

QIU, H. *et al.* Critical review in adsorption kinetic models. **Journal of Zhejiang University-SCIENCE A**, v. 10, n. 5, p. 716–724, 2009.

QUAN, X.; LIU, J.; ZHOU, J. Multiscale modeling and simulations of protein adsorption: progresses and perspectives. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 41, p. 74–85, 2019.

QUYEN, N. D. V. *et al.* Lead ions removal from aqueous solution using modified carbon nanotubes. **Bulletin of Materials Science**, v. 41, n. 1, p. 6, 2018.

RAFIEE-POUR, H.-A. *et al.* Catalase immobilization onto magnetic multi-walled carbon nanotubes: optimization of crucial parameters using response surface methodology. **New Journal of Chemistry**, v. 43, n. 2, p. 593–600, 2019.

RATHINAVEL, S.; PRIYADHARSHINI, K.; PANDA, D. A review on carbon nanotube: An overview of synthesis, properties, functionalization, characterization, and the application. **Materials Science and Engineering: B**, v. 268, p. 115095, 2021.

REN, X. *et al.* Carbon nanotubes as adsorbents in environmental pollution management: A review. **Chemical Engineering Journal**, v. 170, n. 2–3, p. 395–410, 2011.

ROMANOV, S. A. *et al.* Rapid, efficient, and non-destructive purification of single-walled carbon nanotube films from metallic impurities by Joule heating. **Carbon**, v. 168, p. 193–200, 2020.

- RUSSO, V. *et al.* A dynamic intraparticle model for fluid–solid adsorption kinetics. **Computers & Chemical Engineering**, v. 74, p. 66–74, 2015.
- RUTHVEN, D. M. **Principles of adsorption & adsorption process**. New York: John Wiley & Sons, 1984.
- SABZEHMEIDANI, M. M. *et al.* Carbon based materials: a review of adsorbents for inorganic and organic compounds. **Materials Advances**, v. 2, n. 2, p. 598–627, 2021.
- SADÍLEK, P.; ŠATÍNSKÝ, D.; SOLICH, P. Using restricted-access materials and column switching in high-performance liquid chromatography for direct analysis of biologically-active compounds in complex matrices. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 5, p. 375–384, 2007.
- SALAME, I. I.; BANDOSZ, T. J. Role of surface chemistry in adsorption of phenol on activated carbons. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 264, n. 2, p. 307–312, 2003.
- SALEEMI, M. A. *et al.* Toxicity of Carbon Nanotubes: Molecular Mechanisms, Signaling Cascades, and Remedies in Biomedical Applications. **Chemical Research in Toxicology**, v. 34, n. 1, p. 24–46, 2021.
- SAMADANI LANGEROODI, N.; FARHADRAVESH, Z.; DEHNO KHALAJI, A. Optimization of adsorption parameters for Fe (III) ions removal from aqueous solutions by transition metal oxide nanocomposite. **Green Chemistry Letters and Reviews**, v. 11, n. 4, p. 404–413, 2018.
- SAMEJIMA, T.; KAMATA, M.; SHIBATA, K. Dissociation of bovine liver catalase at low pH. **The Journal of Biochemistry**, v. 51, n. 3, p. 181–187, 1962.
- SANGI, M. Determination of labile Cu<sup>2+</sup> in fresh waters by chemiluminescence: interference by iron and other cations. **Talanta**, v. 62, n. 5, p. 924–930, 2004.
- SANGINARIO, A.; MICCOLI, B.; DEMARCHI, D. Carbon Nanotubes as an Effective Opportunity for Cancer Diagnosis and Treatment. **Biosensors**, v. 7, n. 4, p. 9, 2017.
- SANKARARAMAKRISHNAN, N.; GUPTA, A.; VIDYARTHI, S. R. Enhanced arsenic removal at neutral pH using functionalized multiwalled carbon nanotubes. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 2, n. 2, p. 802–810, 2014.
- SANTOS-NETO, A. J. *et al.* Simultaneous analysis of five antidepressant drugs using direct injection of biofluids in a capillary restricted-access media-liquid chromatography–tandem mass spectrometry system. **Journal of Chromatography A**, v. 1189, n. 1–2, p. 514–522, 2008.
- SAVIO, M. *et al.* On-line solid phase extraction of Ni and Pb using carbon nanotubes and modified carbon nanotubes coupled to ETAAS. **Talanta**, v. 85, n. 1, p. 245–251, 2011.
- SHARMA, P. *et al.* Biomedical Applications of Carbon Nanotubes: A Critical Review. **Current Drug Delivery**, v. 13, n. 6, p. 796–817, 2016.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. **Spectrometric identification of organic compounds. 7th ed.** [s.l.]: Wiley, 2005.

SINGH, S. *et al.* Functionalized carbon nanotubes: biomedical applications. **International Journal of Nanomedicine**, p. 5361, 2012.

SINGH, S. *et al.* Mechanism and kinetics of adsorption and removal of heavy metals from wastewater using nanomaterials. **Environmental Chemistry Letters**, 2021.

SOCAS-RODRÍGUEZ, B. *et al.* Recent applications of carbon nanotube sorbents in analytical chemistry. **Journal of Chromatography A**, v. 1357, p. 110–146, 2014.

SOCAS-RODRÍGUEZ, B. *et al.* Recent applications of nanomaterials in food safety. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 96, p. 172–200, 2017.

SOUVERAIN, S.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J.-L. Restricted access materials and large particle supports for on-line sample preparation: an attractive approach for biological fluids analysis. **Journal of Chromatography B**, v. 801, n. 2, p. 141–156, 2004.

SOUZA, I. D. *et al.* Selective molecularly imprinted polymer combined with restricted access material for in-tube SPME/UHPLC-MS/MS of parabens in breast milk samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 932, p. 49–59, 2016.

SOUZA, P. R.; DOTTO, G. L.; SALAU, N. P. G. Experimental and mathematical modeling of hindered diffusion effect of cationic dye in the adsorption onto bentonite. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 7, n. 1, p. 102891, 2019.

SOYEKWO, F. *et al.* Borate crosslinking of polydopamine grafted carbon nanotubes membranes for protein separation. **Chemical Engineering Journal**, v. 337, p. 110–121, 2018.

SOYLAK, M.; UNSAL, Y. E. Chromium and iron determinations in food and herbal plant samples by atomic absorption spectrometry after solid phase extraction on single-walled carbon nanotubes (SWCNTs) disk. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 6, p. 1511–1515, 2010.

SRIVASTAVA, S. Sorption Of Divalent Metal Ions From Aqueous Solution By Oxidized carbon Nanotubes And Nanocages: A Review. **Advanced Materials Letters**, v. 4, n. 1, p. 2–8, 1 2013.

TAJIK, S.; TAHER, M. A. A new sorbent of modified MWCNTs for column preconcentration of ultra trace amounts of zinc in biological and water samples. **Desalination**, v. 278, n. 1–3, p. 57–64, 2011.

TAN, K. L.; HAMEED, B. H. Insight into the adsorption kinetics models for the removal of contaminants from aqueous solutions. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 74, p. 25–48, 2017.

TARDANI, F. *et al.* Experimental Evidence of Single-Stranded DNA Adsorption on Multiwalled Carbon Nanotubes. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 124, n. 12, p. 2514–2525, 2020.

TCHOUL, M. N. *et al.* Effect of Mild Nitric Acid Oxidation on Dispersability, Size, and Structure of Single-Walled Carbon Nanotubes. **Chemistry of Materials**, v. 19, n. 23, p. 5765–5772, 2007.

TOBIASZ, A. *et al.* Application of multiwall carbon nanotubes impregnated with 5-dodecylsalicylaldehyde for on-line copper preconcentration and determination in water samples by flame atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 96, p. 89–95, 2012.

TOFIGHY, M. A.; MOHAMMADI, T. Copper ions removal from aqueous solutions using acid-chitosan functionalized carbon nanotubes sheets. **Desalination and Water Treatment**, v. 57, n. 33, p. 15384–15396, 2016.

TRAN, H. N. *et al.* Mistakes and inconsistencies regarding adsorption of contaminants from aqueous solutions: A critical review. **Water Research**, v. 120, p. 88–116, 2017.

TRIGUEIRO, J. P. C. *et al.* Purity Evaluation of Carbon Nanotube Materials by Thermogravimetric, TEM, and SEM Methods. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 7, n. 10, p. 3477–3486, 1 2007.

VELIČKOVIĆ, Z. *et al.* Adsorption of arsenate on iron (III) oxide coated ethylenediamine functionalized multiwall carbon nanotubes. **Chemical Engineering Journal**, v. 181–182, p. 174–181, 2012.

VENKATA RAMANA, D. K.; YU, J. S.; SESHIAIAH, K. Silver nanoparticles deposited multiwalled carbon nanotubes for removal of Cu (II) and Cd (II) from water: Surface, kinetic, equilibrium, and thermal adsorption properties. **Chemical Engineering Journal**, v. 223, p. 806–815, 2013.

VERMA, B.; BALOMAJUMDER, C. Surface modification of one-dimensional Carbon Nanotubes: A review for the management of heavy metals in wastewater. **Environmental Technology & Innovation**, v. 17, p. 100596, 2020.

VIEIRA, A. C.; SANTOS, M. G.; FIGUEIREDO, E. C. Solid-phase extraction of triazole fungicides from water samples using disks impregnated with carbon nanotubes followed by GC-MS analysis. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 97, n. 1, p. 29–41, 2017.

WANG, H. *et al.* Mechanism study on adsorption of acidified multiwalled carbon nanotubes to Pb(II). **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 316, n. 2, p. 277–283, 2007.

WANG, J.; GUO, X. Adsorption kinetic models: Physical meanings, applications, and solving methods. **Journal of Hazardous Materials**, v. 390, p. 122156, 2020.

WANG, Y. *et al.* Determination of trace amounts of Se (IV) by hydride generation atomic fluorescence spectrometry after solid-phase extraction using magnetic multi-walled carbon nanotubes. **Talanta**, v. 112, p. 123–128, 2013.

WEBER, W. J.; MORRIS, J. C. Kinetics of Adsorption on Carbon from Solution. **Journal of the Sanitary Engineering Division**, v. 89, p. 31–59, 1963.

WILLEMSSEN, O.; MACHTEJEVAS, E.; UNGER, K. K. Enrichment of proteinaceous materials on a strong cation-exchange diol silica restricted access material: protein–protein displacement and interaction effects. **Journal of Chromatography A**, v. 1025, n. 2, p. 209–216, 2004.

XU, J. *et al.* A review of functionalized carbon nanotubes and graphene for heavy metal adsorption from water: Preparation, application, and mechanism. **Chemosphere**, v. 195, p. 351–364, 2018.

XU, W. *et al.* Determination of sulfonamides in bovine milk with column-switching high performance liquid chromatography using surface imprinted silica with hydrophilic external layer as restricted access and selective extraction material. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 46, p. 7198–7207, 2010.

YAMAMOTO, E. *et al.* Effective on-line extraction of drugs from plasma using a restricted-access media column in column-switching HPLC equipped with a dilution system: Application to the simultaneous determination of ER-118585 and its metabolites in canine plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 49, n. 5, p. 1250–1255, 2009.

YANG, B. *et al.* Preconcentration and determination of lead and cadmium in water samples with a MnO<sub>2</sub> coated carbon nanotubes by using ETAAS. **Desalination**, v. 278, n. 1–3, p. 65–69, 2011.

YANG, J. *et al.* Removal of Co (II) from aqueous solutions by sulfonated magnetic multi-walled carbon nanotubes. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 32, n. 11, p. 2247–2256, 2015.

YANG, X. *et al.* Surface functional groups of carbon-based adsorbents and their roles in the removal of heavy metals from aqueous solutions: A critical review. **Chemical Engineering Journal**, v. 366, p. 608–621, 2019.

YIN, Z. *et al.* The Application of Carbon Nanotube/Graphene-Based Nanomaterials in Wastewater Treatment. **Small**, v. 16, n. 15, p. 1902301, 2020.

ZHAI, H. *et al.* Acylation modification of konjac glucomannan and its adsorption of Fe (III) ion. **Carbohydrate Research**, v. 497, p. 108133, 2020.

ZHANG, D.; YIN, Y.; LIU, J. Removal of Hg<sup>2+</sup> and methylmercury in waters by functionalized multi-walled carbon nanotubes: adsorption behavior and the impacts of some environmentally relevant factors. **Chemical Speciation & Bioavailability**, v. 29, n. 1, p. 161–169, 2017.

ZHANG, J. *et al.* Effect of Chemical Oxidation on the Structure of Single-Walled Carbon Nanotubes. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 107, n. 16, p. 3712–3718, 2003.

ZHANG, T. *et al.* MWCNT interactions with protein: surface-induced changes in protein adsorption and the impact of protein corona on cellular uptake and cytotoxicity. **International Journal of Nanomedicine**, v. Volume 14, p. 993–1009, 2019.

ZHANG, Y. *et al.* Determination of melamine and cyromazine in milk by high performance liquid chromatography coupled with online solid-phase extraction using a novel cation-exchange restricted access material synthesized by surface initiated atom transfer radical polymerization. **Journal of Chromatography A**, v. 1337, p. 17–21, 2014.

ZHAO, X. *et al.* Exploring the diameter and surface dependent conformational changes in carbon nanotube-protein corona and the related cytotoxicity. **Journal of Hazardous Materials**, v. 292, p. 98–107, 2015.

ZHOU, W. *et al.* Raman scattering and thermogravimetric analysis of iodine-doped multiwall carbon nanotubes. **Applied Physics Letters**, v. 80, n. 14, p. 2553–2555, 2002.

ZHOU, W.; SASAKI, S.; KAWASAKI, A. Effective control of nanodefects in multiwalled carbon nanotubes by acid treatment. **Carbon**, v. 78, p. 121–129, 2014.